

**HIPERWALENTNE ZWIĄZKI SIARKI,
SELENU I TELLURU. CZĘŚĆ 2.
SULFURANY 10-S-3 I 10-S-4**

**HYPERVALENT COMPOUNDS OF SULFUR,
SELENIUM AND TELLURIUM. PART 2.
SULFURANES 10-S-3 AND 10-S-4**

Adrian Zając

*Zakład Chemii Heteroorganicznej,
Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk, ul.
Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź
e-mail: adrian@cbmm.lodz.pl*

Abstract

1. Sulfurany 10-S-3
2. Sulfurany 10-S-4

Piśmiennictwo cytowane



Dr Adrian Zając ukończył Wydział Matematyczno-Przyrodniczy Akademii im. Jana Długosza w Częstochowie w 2005 roku. Tytuł doktora nauk chemicznych nadano mu w Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi w 2011 roku po obronie rozprawy doktorskiej zatytułowanej: „Wybrane połączenia siarkoorganiczne z nisko- i/lub wysokokoordynacyjnym atomem siarki” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Józefa Drabowicza. Obecnie pracuje w Zakładzie Chemii Heteroorganicznej CBMiM PAN.

W kręgu jego zainteresowań znajduje się chemia prochiralnych i chiralnych związków heteroorganicznych, w szczególności siarko- i fosforoorganicznych, w tym związków hiperwaleńnych. Jest współautorem kilkunastu publikacji, zarówno oryginalnych, przeglądowych, jak i rozdziałów w książkach, takich jak *Science of Synthesis* czy *Patai's Chemistry of Functional Groups*.

ABSTRACT

The compounds presented herein are sulfuranes 10-S-3 and 10-S-4 containing hypervalent sulfur atom. They have been known for a relatively long time. Nevertheless, they, and especially 10-S-4 species, are still of great interest due to their unique properties. The review presents recent approaches to the synthesis of these compounds, their selected structural, physical, chemical, stereochemical and electronic properties and their use as reagents and catalysts in several reaction types. The presence of structures of these types as intermediates, which explains selected reaction mechanisms, will also be shown.

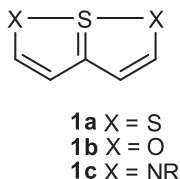
Keywords: hypervalency, 3c-4e bond, sulfurane 10-S-3, sulfurane 10-S-4, Berry pseudorotation, trigonal bipyramid, synthesis, chirality, optical activity, isomerization, ligand coupling, ligand exchange

Słowa kluczowe: hiperwaleńność, wiązanie 3c-4e, sulfuran, pseudorotacja Berry'ego, bipyramida trygonalna, synteza, chiralność, czynność optyczna, izomeryzacja, sprzężanie ligandów, wymiana liganda

Historia badań nad organicznymi hiperwalentnymi związkami siarki sięga lat 70. XX wieku. Od tamtej pory chemia tej grupy organicznych związków siarki bardzo się rozwinęła i stała się przedmiotem kilku artykułów przeglądowych [1, 2]. W tym podrozdziale przedstawię najnowsze wyniki badań nad syntezą, stereochemią, właściwościami, reaktywnością i zastosowaniami tych połączeń siarkowych.

1. SULFURANY 10-S-3

Z tej grupy hiperwalentnych związków siarki prawdopodobnie najbardziej znanymi są tiatioften i jego analogi **1a-c** (Rys. 1). Posiadają one 3c–4e wiązanie intramolekularne między centralnym atomem siarki a dwoma heteroatomami, którego długość zależy od elektroujemności podstawników [3].

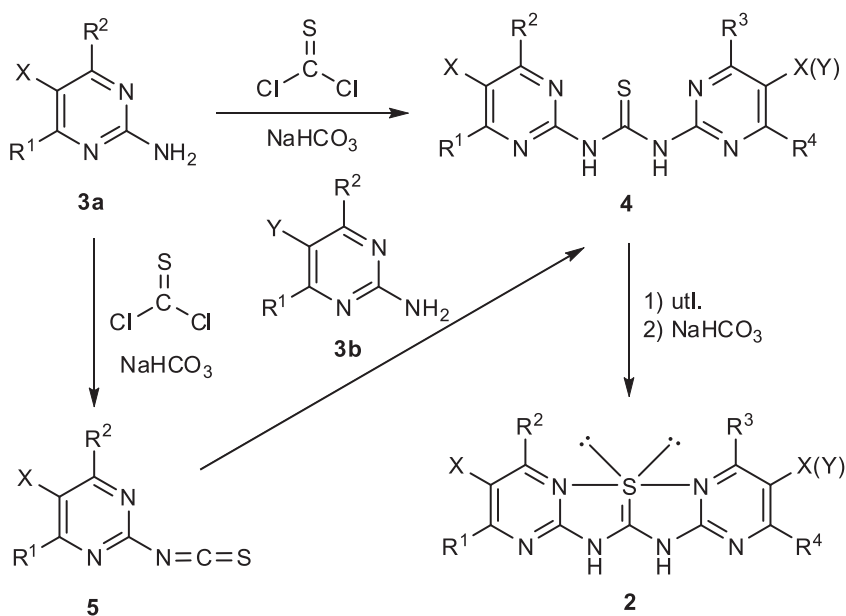


Rysunek 1
Figure 1

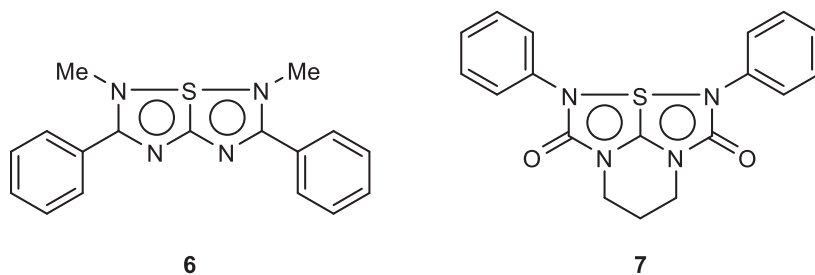
Na Schemacie 1 przedstawiona jest synteza analogów związków **1c** zawierających dodatkowo skondensowane pierścienie elektronoakceptorowe stabilizujące wiązanie hiperwalentne **2**. Potraktowanie pochodnych 2-aminopirymidyny **3a** tiofosgenem w obecności wodorowęglanu sodu dostarczyło odpowiednich symetrycznych tiomoczników **4**. Reakcja **3b** z izotiocyanianami **5** prowadziła do otrzymania odpowiednich niesymetrycznych tiomoczników **4**. Cyklizacja tych ostatnich za pomocą chlorku siarczyny oraz *N*-bromo- lub *N*-chloroimidu kwasu bursztynowego skutkowało otrzymywaniem pochodnych tetraazatiapantenu **2** (Schemat 1) [3].

Dane rentgenostrukturalne zebrane dla związków **6** i **7** (Rys. 2) świadczą o tym, że długość wiązania S–N (1,90–1,96 Å) jest większa od typowego wiązania między tymi atomami (1,74 Å) o ok. 10%, co sugeruje istnienie właściwego dla połączeń hiperwalentnych wiązania 3c–4e między tymi atomami [4].

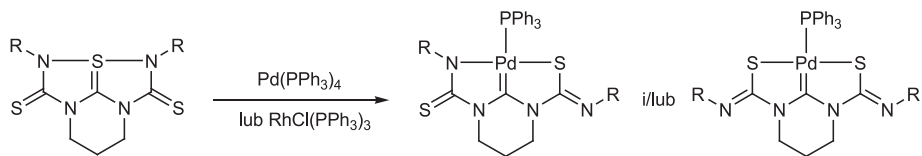
Tego typu związki tworzą „karbenowe kompleksy” palladowe i rodowe w reakcji, odpowiednio, z tetrakis(trifenylfosfinylo)palladem, Pd(PPh₃)₄, i chlorkiem tris(trifenylfosfinylo)rodu, RhCl(PPh₃)₃, w odgazowanym benzenie w temperaturze pokojowej przez 48 h (Schemat 2) [5].



Schemat 1
Scheme 1



Rysunek 2
Figure 2



R = Me, Et, *p*-ClC₆H₄, *p*-MeOC₆H₄

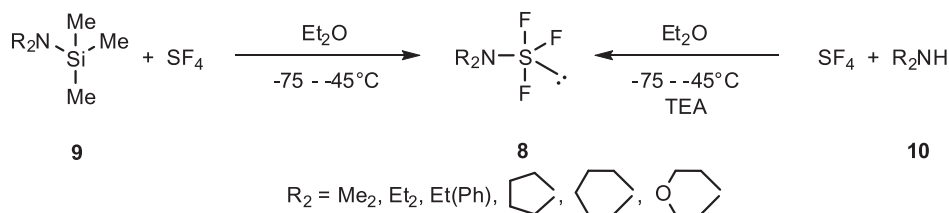
Schemat 2
Scheme 2

2. SULFURANY 10-S-4

Jest to jedna z najlepiej poznanych grup hiperwalentnych związków siarki. Szczególnie dobrze znane są bicykliczne spirosulfurany.

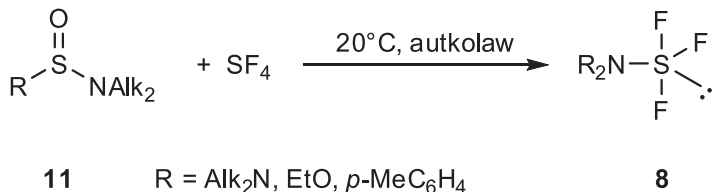
Trwałe chemicznie struktury tego typu zawierają z reguły w pozycjach apikalnych atomy pierwiastków elektroujemnych, jak halogenowce, a także ligandy tlenowe, azotowe, siarkowe, a nawet węglowe.

Dialkiloaminotrifluorosulfurany **8** zostały otrzymane w reakcji dialkiloaminotrimetylosilanów **9** z tetrafluorkiem siarki w eterze dietylowym jako rozpuszczalniku i w temperaturze od -75°C do -45°C (Schemat 3), a także w tych samych warunkach z użyciem drugorzędowych amin **10** i tetrafluorku siarki w obecności trietyloaminy jako akceptora fluorowodoru (Schemat 3) [6].



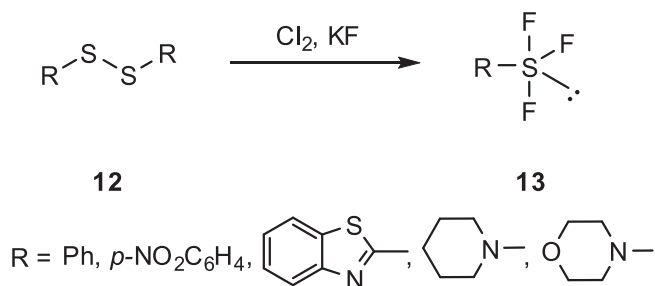
Schemat 3
Scheme 3

Inną drogą syntezy **8** była reakcja sulfinamidów **11** z tetrafluorkiem siarki w temperaturze 20°C przy użyciu autoklawu (Schemat 4) [6].



Schemat 4
Scheme 4

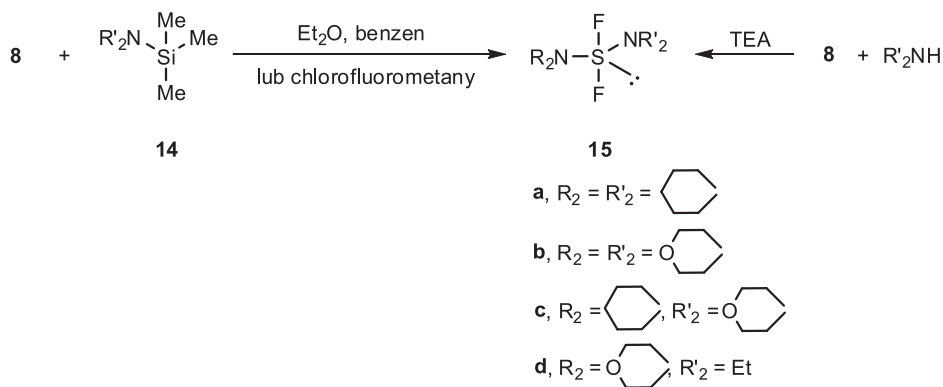
Reakcja disulfidów (disiarczków) **12** z chlorem w obecności nadmiaru fluorku potasu prowadzi do powstawania odpowiednich trifluorosulfuranów **13** (Schemat 5) [6].



Schemat 5
Scheme 5

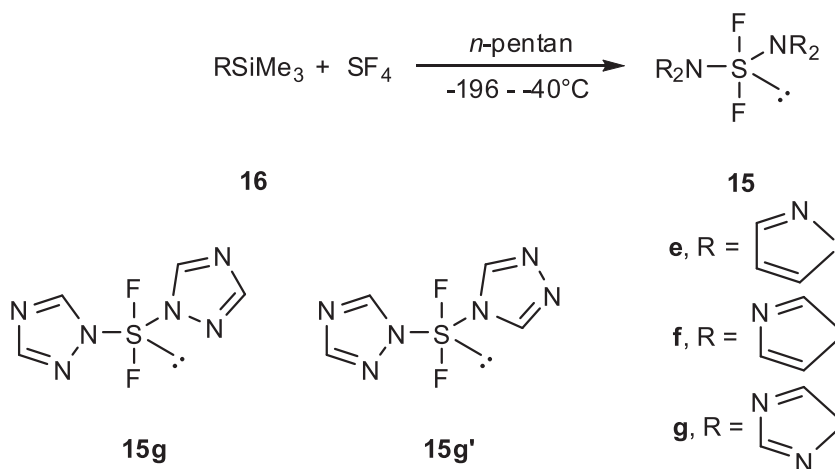
Związki **8** zostały z powodzeniem zastosowane jako odczynniki fluorujące aldehydy i ketony oraz organiczne związki chloru [6].

Sulfurany **8** reagowały z dialkiloaminotrimetylosilanami **14** dając odpowiednie bis(dialkiloamino)difluorosulfurany **15** z ilościową wydajnością; podobny efekt dała reakcja **8** z drugorzędowymi aminami w obecności trietyloaminy, jednak wydajności były w tym wypadku niskie, a proces oczyszczania trudny (Schemat 6) [6].



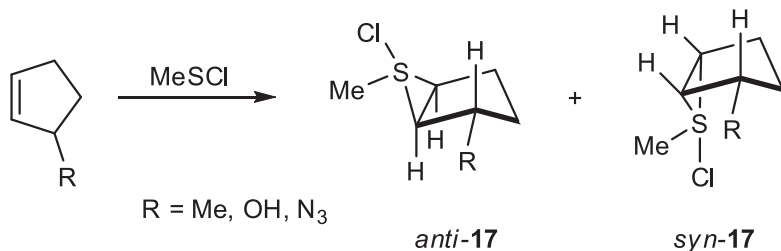
Schemat 6
Scheme 6

Bisaminosulfurany **15** (R = pirazol, imidazol lub triazol) zostały także otrzymane z wysokimi wydajnościami (89–96%) w reakcji odpowiednich siliowych pochodnych azacykli **16** z tetrafluorkiem siarki prowadzonej w *n*-pentanie jako rozpuszczalniku w temperaturze od -196°C do -40°C (Schemat 7). Analiza widm ^1H i ^{19}F NMR wykazała dla **15g** istnienie w roztworze w niewielkiej ilości (6–8%) niesymetrycznego izomeru **15g'**. Badania rentgenograficzne potwierdziły geometrię bipiramidy trygonalnej otrzymanych związków [7].



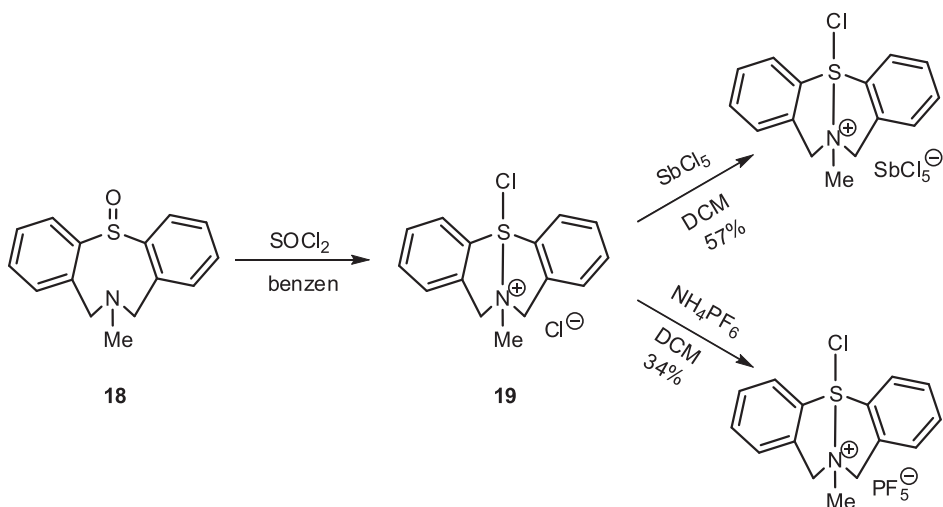
Schemat 7
Scheme 7

Reakcja 3-podstawionych cyklopentenów z chlorkiem metanosulfonylowym dostarczyła *syn*- i *anti*-monochlorosulfuranów **17** jako produktów addycji chloru sulfonylowego do wiązania podwójnego (Schemat 8) [8].



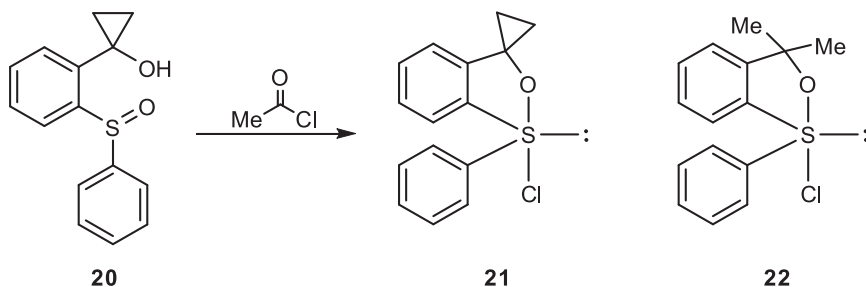
Schemat 8
Scheme 8

Potraktowanie sulfotlenku **18** chlorkiem tionylu w suchym benzenie jako rozpuszczalniku prowadziło do powstania odpowiedniego silnie higroskopijnego chloru monochlorosulfuranu **19** z prawie ilościową wydajnością (Schemat 9). Przeprowadzenie go w odpowiednie sole z anionami heksachloroantymonianowym lub heksafluorofosforanowym spowodowało zwiększenie trwałości tworzących się struktur sulfuranowych [9].



Schemat 9
Scheme 9

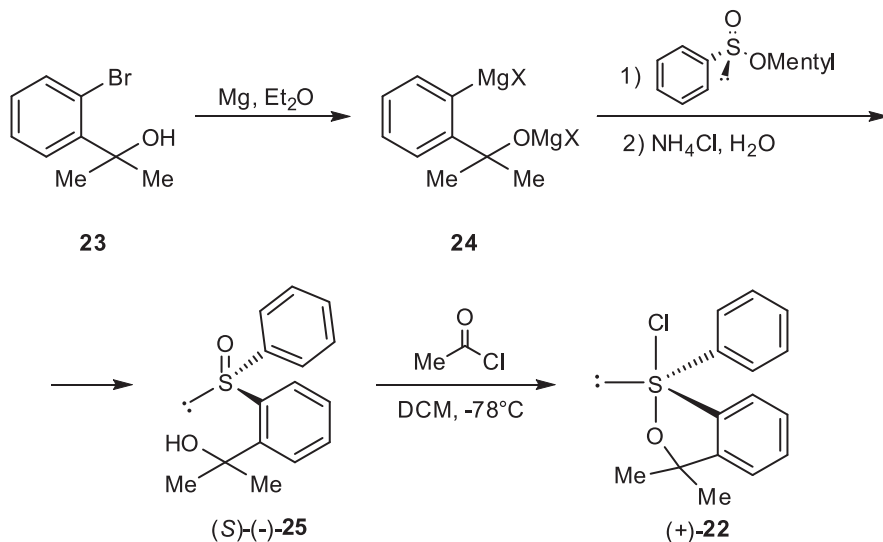
Otrzymano także kilka stabilnych chlorooksasulfuranów. Poddając sulfotlenek **20** reakcji z chlorkiem acetylu otrzymano podstawiony pierścieniem cyclopropanowym chlorooksasulfuran **21** (Schemat 10). Na podstawie eksperymentów ^{13}C NMR stwierdzono, że hydrolizuje on 2×10^3 razy szybciej niż jego analog nie posiadający w swojej budowie pierścienia cyclopropylowego **22** [10].



Schemat 10
Scheme 10

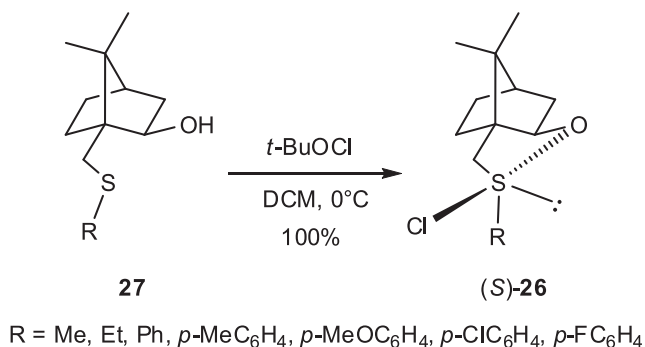
Sulfuran **22** zsyntetyzowano jako enancjomerycznie wzbogacony (ee = 95%) wychodząc z alkoholu *o*-bromokumylowego **23** i poddając go działaniu metalicznego magnezu w eterze dietylowym, co skutkowało tworzeniem di(halogenomagnezo) pochodnej **24**, która następnie reagowała z diastereomerycznie czystym (S_C)-benzenosulfinianem *O*-mentylowym dostarczając z inwersją konfiguracji sulfotlenek (*S*)-(-)-**25**. Sulfotlenek ten transformowano do sulfuranu (+)-**22** za pomocą chlorku acetylu (Schemat 11). Jego czystość enancjomeryczną oznaczono metodą Pirkla używając (*S*)-(+)-1-(10-metylo-9-antrylo)-2,2,2-trifluoroetanolu w deutero-

chloroformie i analizując widmo ^1H NMR powstającego *in situ* dynamicznego układu diastereomerycznego [11].



Schemat 11
Scheme 11

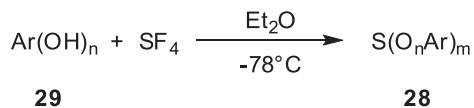
Koizumi i współpracownicy otrzymali z ilościowymi wydajnościami diastereomeryczne chlorooksasulfurany **26** traktując odpowiednie hydroksypodstawione sulfidy **27** nadmiarem chloranu(I) *tert*-butylu, w suchym dichlorometanie jako rozpuszczalniku w temperaturze 0°C w atmosferze azotu (Schemat 12). Szczegółowo zbadali też ich hydrolizę do acyklicznych sulfotlenków, stwierdzając że przebiega ona z retencją konfiguracji na atomie siarki [12, 13].



Schemat 12
Scheme 12

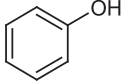
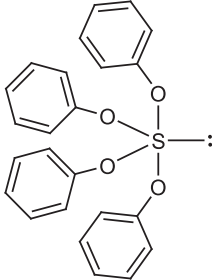
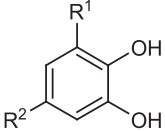
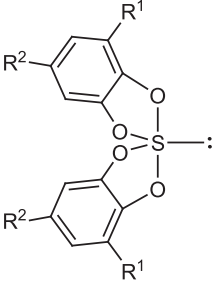
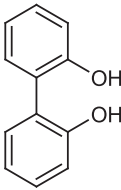
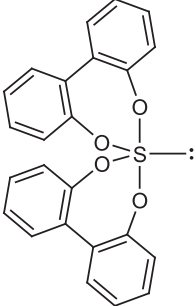
Tetraoksosulfurany **28** otrzymano w reakcji litopochodnych odpowiednich fenoli mono- lub dihydroksylowych **29** z tetrafluorkiem siarki w suchym eterze die-

tyłowym jako rozpuszczalniku przy -78°C w atmosferze suchego azotu (Schemat 13, Tab. 1). Otrzymane z wysoką wydajnością produkty **28** są skrajnie wrażliwe na wilgoć, niemniej jednak ich przechowywanie w suchej atmosferze w -5°C wydłuża ich czas życia do kilku tygodni [14].

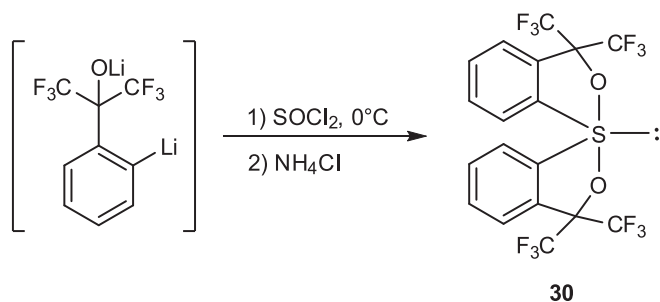


Schemat 13
Scheme 13

Tabela 1
Table 1

	Ar(OH)_n	$\text{S(O}_n\text{Ar)}_m$
a		
b	$\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{H}$ $\text{R}^1 = \text{Me}, \text{R}^2 = \text{H}$ $\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{t-Bu}$ 	
c		

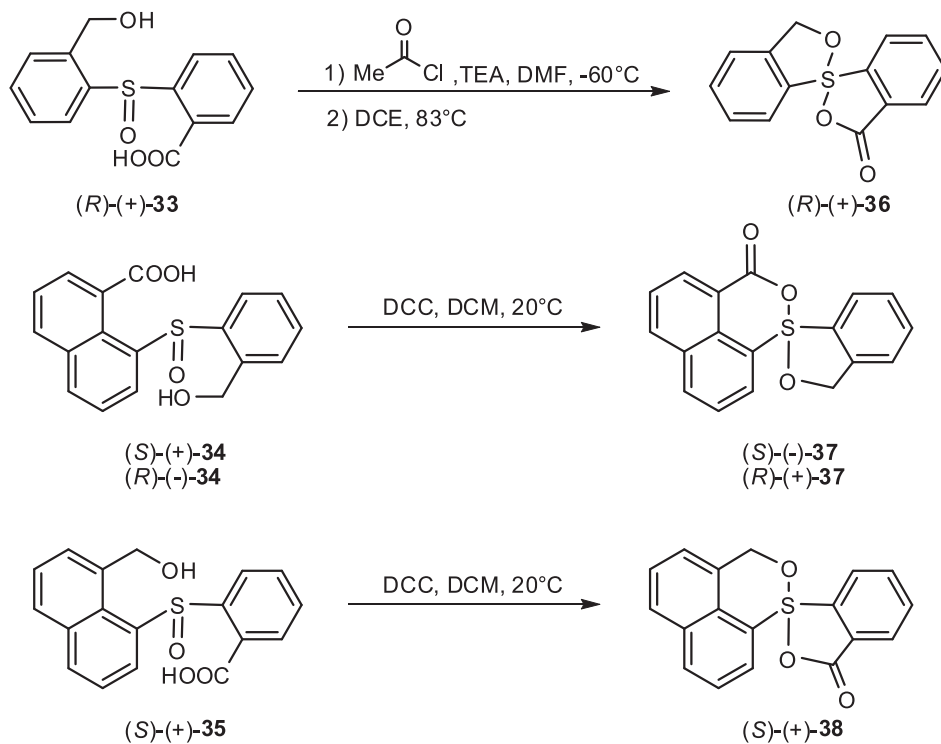
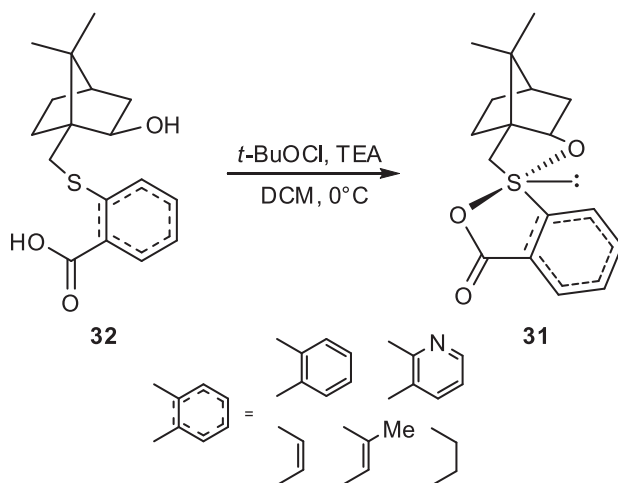
Kolejną grupą sulfuranów 10-S-4 stanowią dioksasulfurany 10-S-4(O₂C₂). Wychodząc z alkoholu perfluorokumylowego, a dokładniej z jego dilitopochodnej i traktując ją nadmiarem chlorku tionylu w temperaturze 0°C otrzymano dioksasulfuran **30** z wydajnością 62% (Schemat 14). Użycie ditlenku siarki i dichlorku siarki zamiast chlorku tionylu skutkowało znacznym obniżeniem wydajności, odpowiednio, do 8% lub 16%. Związek **30** charakteryzuje się dużą trwałością ze względu na obecność elektronoakceptorowych grup perfluorometylowych [15].



Schemat 14
Scheme 14

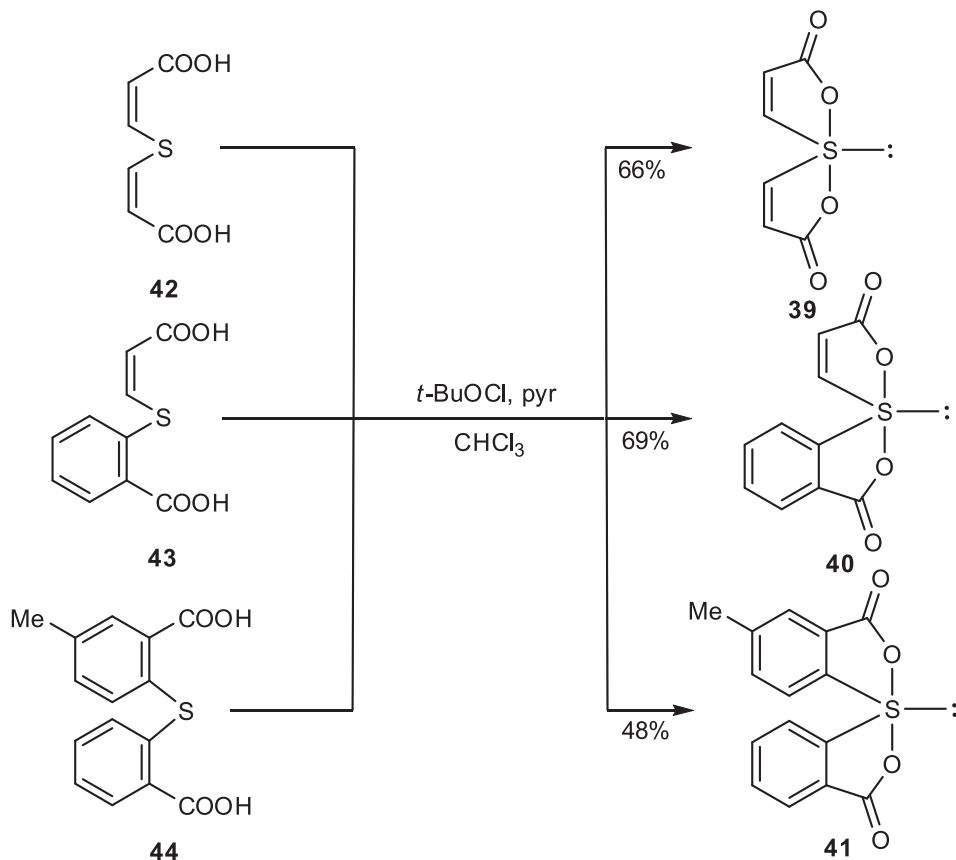
Bornylodioksasulfurany **31** zostały otrzymane z wysokimi wydajnościami (80–98%) jako stosunkowo trwale czyste diastereomeryczne produkty z odpowiednich sulfidów **32** (Schemat 15) według procedury przedstawionej na Schemacie 12 z użyciem trietyloaminy. Ich hiperwaleńne struktury o geometrii bipiramidy trygonalnej zostały potwierdzone metodami rentgenografii strukturalnej. Badania hydrolizy tych związków, także z użyciem znaczonej izotopowo wody H₂¹⁸O i H₂¹⁷O, pozwoliły na otrzymanie obu diastereoizomerów odpowiednich sulfotlenków (w zależności od pH środowiska reakcji) oraz opisanie stereochemii tego procesu [16, 17].

Optycznie czynne sulfotlenki **33–35** przeprowadzono w odpowiednie optycznie czynne sulfurany **36–38** poprzez przemiany zestawione na Schemacie 16 (w przypadku sulfotlenku **33** była to reakcja z chlorkiem acetylu w *N,N*-dimetyloformamidzie jako rozpuszczalniku przy –60°C w obecności trietyloaminy, a następnie ogrzewanie w temperaturze wrzenia w 1,2-dichloroetanie.



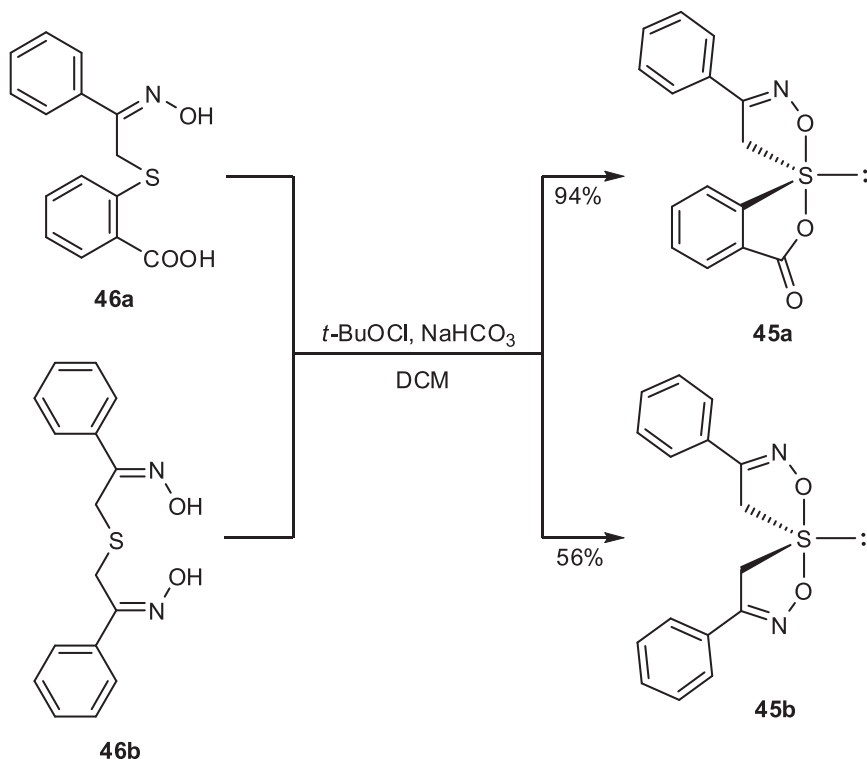
Natomiast w przypadku sulfotlenków **34** i **35** odwadnianie przy użyciu dicykloheksylokarbodiimidu w dichlorometanie jako rozpuszczalniku w temperaturze 20°C. Konfiguracja absolutna produktów została ustalona na podstawie analiz rentgenostrukturalnych lub, w przypadku **38**, na podstawie porównawczej analizy CD [18]. Opisano transformacje połączeń **36–38** do odpowiednich tetrafluoroboranów sulfoniowych [19].

Sulfurany **39–41** posiadające dwa ugrupowania C(O)O w pozycjach apikalnych zostały zsyntetyzowane z odpowiednich „dikarboksylowych” sulfidów **42–44** przy użyciu chloranu(I) *tert*-butylu w obecności pirydyny w chloroformie (Schemat 17) [20].



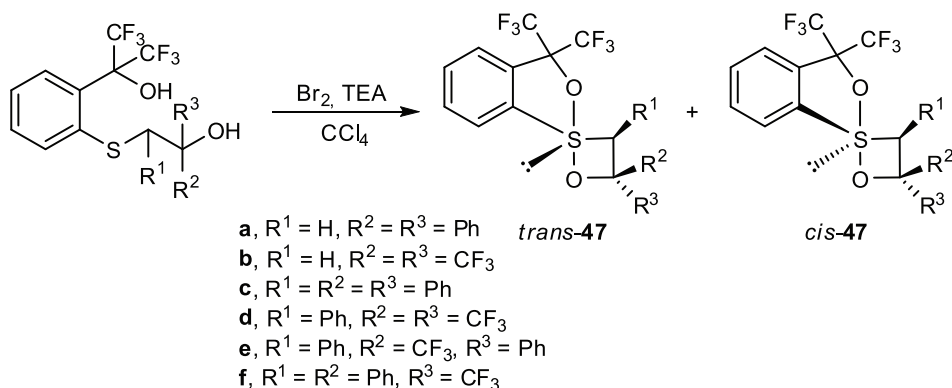
Schemat 17
Scheme 17

Dokonano także syntezy sulfuranów **45a** i **45b** zawierających jeden lub dwa apikalne ligandy z ugrupowaniem –N=O–. Podobnie jak powyżej, odpowiednie sulfidy **46a** i **46b** poddano działaniu chloranu(I) *tert*-butylu, ale w tym przypadku w obecności wodorowęglanu sodu zawieszzonego w suchym dichlorometanie (Schemat 18) [21].



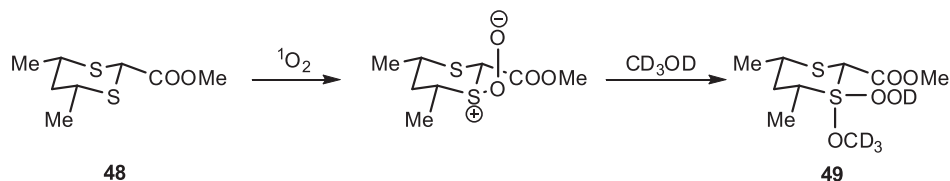
Schemat 18
Scheme 18

Bicykliczne spirosulfurany zawierające w swej strukturze pierścień pięcio- i czteroczłonowy **45** otrzymano w reakcji odpowiednich dihydroxysulfidów, pochodnych alkoholu perfluorokumylowego z bromem w obecności trietyloaminy w tetrachlorku węgla jako rozpuszczalniku (Schemat 19). Wyizolowano zarówno izomery *cis*, jak i *trans*. Obecność produktów **47a** potwierdzono jedynie metodami spektroskopowymi, ponieważ struktury okazały się nietrwałymi i wrażliwymi na wilgoć. Pozostałe związki **47b-f** były stabilne. W trakcie termolizy związków *trans-47* zaobserwowano ich izomeryzację do izomeru *cis*. Przeprowadzono także reakcję ich utleniania, co będzie opisane później [22].



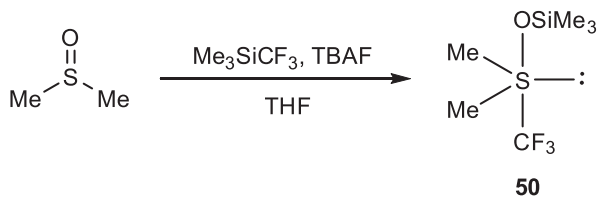
Schemat 19
Scheme 19

Toutchkine i Clennan badając reakcję utleniania singletowym tlenem podstawionego ditiacykloheksanu **48** otrzymali sulfuran **49** z ugrupowaniem nadtlenkowym i zaproponowali mechanizm jego tworzenia z udziałem ylidu peroksulfonowego, który, poddany działaniu perdeuterowanego metanolu, dostarczył finalnego produktu (Schemat 20) [23].

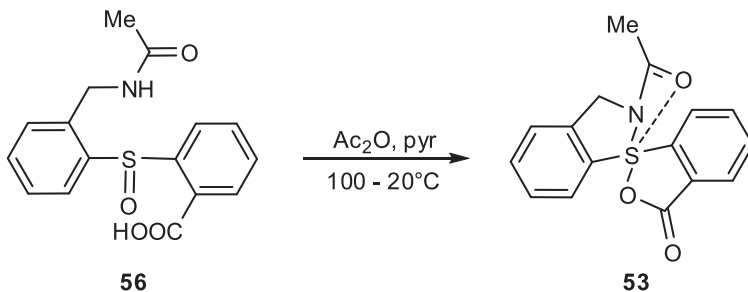
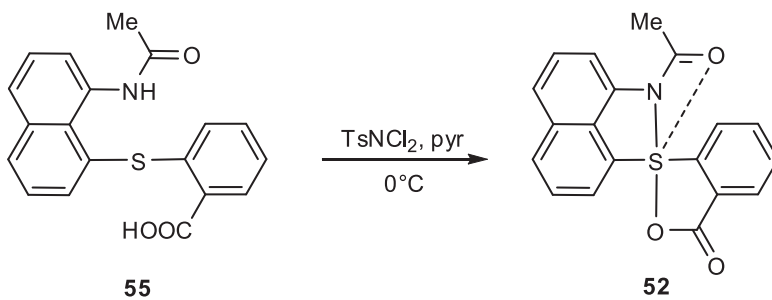
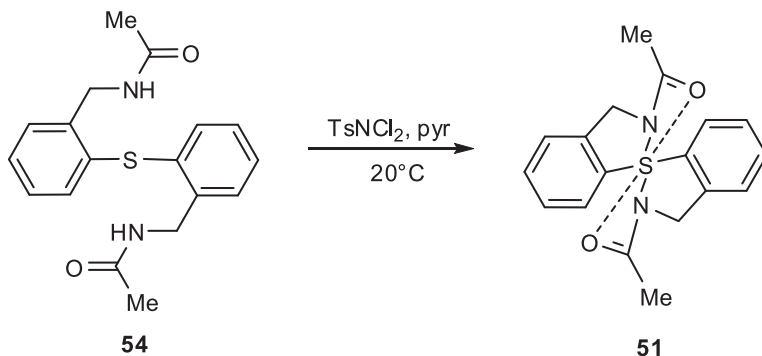


Schemat 20
Scheme 20

Generowanie *in situ* monoooksulfuranu posiadającego węglowy ligand w pozycji apikalnej **50** zaproponowano dla reakcji dimetylosulfotlenku z (trifluorometylo)trimetylosilanem prowadzonej w obecności katalitycznej ilości fluorku tetra(*n*-butylo)amoniowego w tetrahydrofuranie jako rozpuszczalniku (Schemat 21). Reakcja silnie zależała od użytego rozpuszczalnika oraz źródła jonów fluorkowych. W acetonitrylu i cyanobenzenie reakcja nie zachodziła. Przy użyciu fluorku potasu jako źródła jonów F^- reakcja także nie zachodziła niezależnie od użytego rozpuszczalnika [24].



Schemat 21
Scheme 21



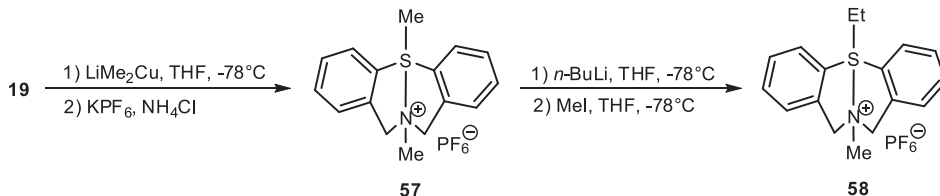
Schemat 22
Scheme 22

Diazosulfuran **51** oraz azooksyulfurany **52** i **53** zostały otrzymane z odpowiednich sulfidów **54** i **55** na drodze utleniającej cyklizacji za pomocą dichloroaminy T

w pirydynie jako rozpuszczalniku w 20°C lub 0°C, i z sulfotlenku **56** poprzez jego cyklizację przebiegającą w obecności bezwodnika octowego w pirydynie w podwyższonej temperaturze (Schemat 22). Analiza rentgenostrukturalna potwierdziła geometrię bipiramidy trygonalnej tych struktur. Długości wiązań S-N w związku **51** (1,93 Å) są typowe dla połączeń hiperwalentnych, natomiast w połączeniach **52** i **53** wiązania S-N (odpowiednio, 1,80 Å i 1,73 Å) traktowane są jako wydłużone wiązania kowalencyjne, natomiast wiązania S-O (odpowiednio, 2,07 Å i 2,23 Å) – jako silnie spolaryzowane wiązania hiperwalentne. Zaobserwowano tu także wyraźne intramolekularne oddziaływanie typu 1,4 między atomem siarki a atomami tlenu grupy karbonylowej [25].

Amoniosulfuran **57**, posiadający grupę metylową w pozycji apikalnej, zsyntetyzowano ze związku **19**, traktując go litodimetylomiedzią w -78°C w tetrahydrofuranie jako rozpuszczalniku i izolując jako heksafluorofosforan. Etylową pochodną **58** otrzymano z **57** generując ylid siarkowy za pomocą *n*-butylolitu w -78°C w tetrahydrofuranie i „metylując” go jodkiem metylu (Schemat 23) [9].

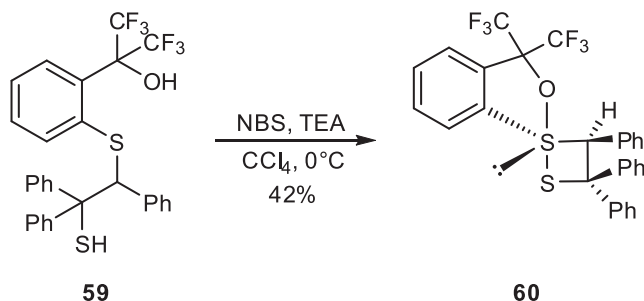
Merkaptosulfid **59**, poddany działaniu *N*-bromoimidu kwasu bursztynowego w obecności trietyloaminy w tetrachlorku węgla w 0°C dostarczył z wydajnością 42% oksatiasulfuran **60** (Schemat 24). Badania rentgenograficzne potwierdziły jego sulfuranową strukturę z zajmującym apikalną pozycję sulfanowym atomem siarki. Związek **60** był odporny na działanie tlenu atmosferycznego, ulegał jednak natychmiastowemu rozkładowi w obecności wilgoci [26].



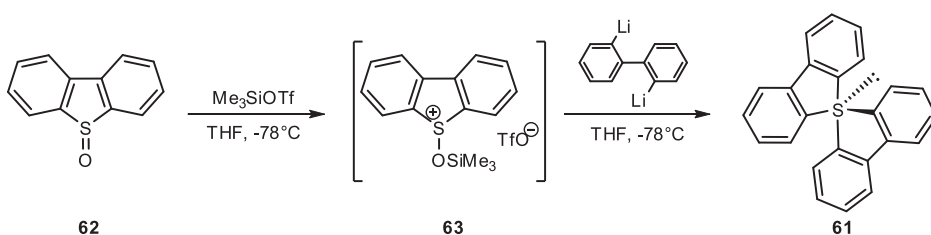
Schemat 23
Scheme 23

Stosunkowo niedawno udało się także wyizolować i w pełni scharakteryzować sulfuran posiadający cztery ligandy węglowe **61**. Reakcja S-tlenku dibenzotiofenu **62** z trifluorometanosulfonianem trimetylosililowym w tetrahydrofuranie jako rozpuszczalniku w temperaturze -78°C skutkowałą tworzeniem przejściowego triflanu **63**, który z kolei reagował *in situ* z 2,2'-dilitobifenylem dając spiro-sulfuran **61** (Schemat 25). Ustalenie struktury krystalicznej pozwoliło na wyznaczenie długości wiązań. Długości wiązań ekwatorialnych są równe, odpowiednio, 1,823 Å i 1,814 Å, natomiast apikalnych – 1,926 Å i jest to jak dotąd najdłuższe znane wiązania S-C(aryl). Analiza widm ^1H i ^{13}C NMR zarejestrowanych w temperaturze pokojowej oraz w obniżonej (-100°C) wykazała równocześnie pierścieni aromatycznych. Autorzy wyjaśnili ten fakt zakładając obecność procesów pseudorotacji w obu wypadkach [62]. W reakcji sulfuranu **61** z difluorkiem ksenonu w mieszaninie dichlorometanu

i eteru dietylowego w -78°C otrzymano odpowiedni dikation sulfoniowy i zbadano jego strukturę i reaktywność [27].



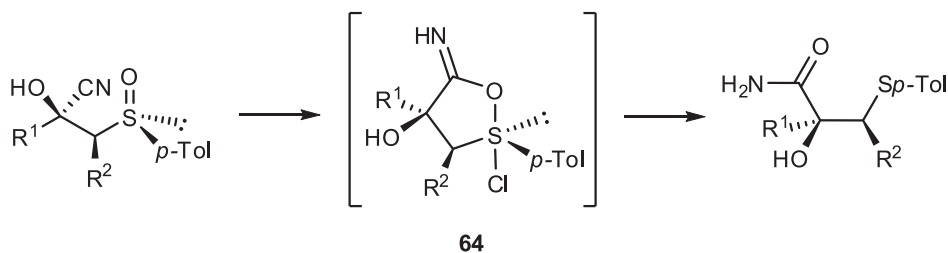
Schemat 24
Scheme 24



Schemat 25
Scheme 25

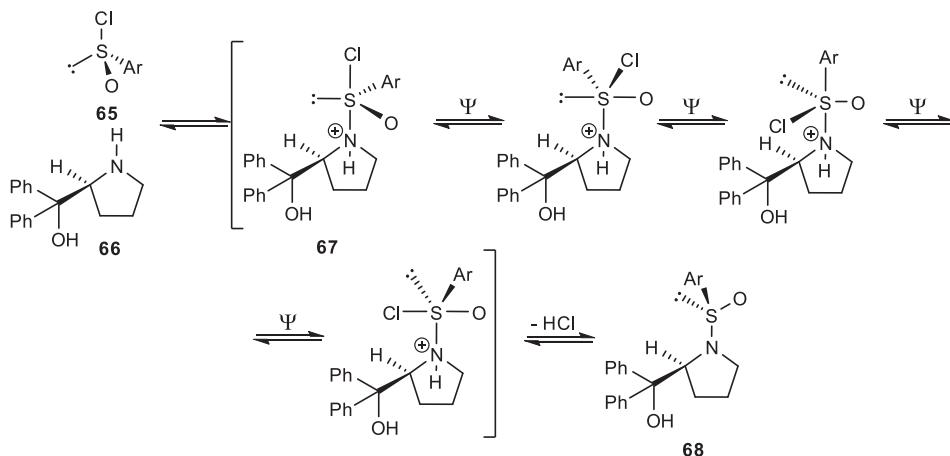
Choć przedstawione powyżej struktury zostały wyizolowane i opisane jako trwałe połączenia, większość sulfuranów jest nietrwała i ekstremalnie wrażliwa na warunki środowiska. Wiele z nich to wykrywane *in situ* produkty przejściowe znanych reakcji.

Chlorooksulfurany **64** zostały zaproponowane jako produkty przejściowe reakcji kwasowej hydrolizy grupy cyjanowej β -cyjanosulfotlenków (Schemat 26) [28, 29].



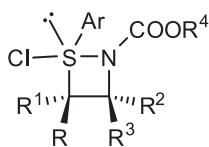
Schemat 26
Scheme 26

W reakcji chlorków arenosulfinylowych **65** z pochodną piroolidyny **66** tworzył się jako produkt przejściowy amonochlorooksulfuran **67**, ulegający szybkiej pseudorotacji Berry'ego, wynikiem której jest utworzenie produktu – sulfamidu **68** (Schemat 27) [30].



Schemat 27
Scheme 27

Traktowanie *N*-alkoksykarbonylo- β -sulfinyloamin o znanej konfiguracji chlorkiem oksalilu w obecności *sym*-kolidyny w dichlorometanie jako rozpuszczalniku przy -50°C skutkowało szybkim i stereoselektywnym tworzeniem β -chlorosulfenamidów. Proces ten nazwano nieoksydatywną reakcją chloro-Pummerera, a w zaproponowanym przez autorów mechanizmie kluczową rolę odgrywa azochlorosulfuran **69** (Rys. 3) [31].

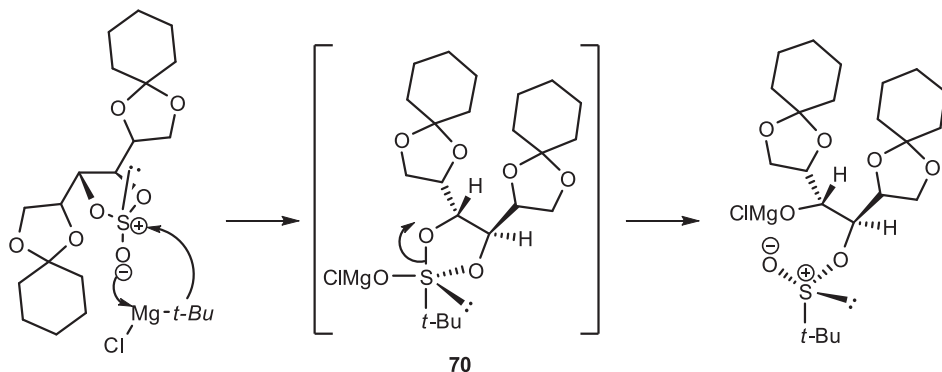


69

Rysunek 3
Figure 3

Udział dioksasulfuranu **70** zaproponowano, aby wyjaśnić stereospecyficzność reakcji siarcznanu (IV), pochodnej mannitolu, z chlorkiem *tert*-butylomagnezowym (Schemat 28) [32].

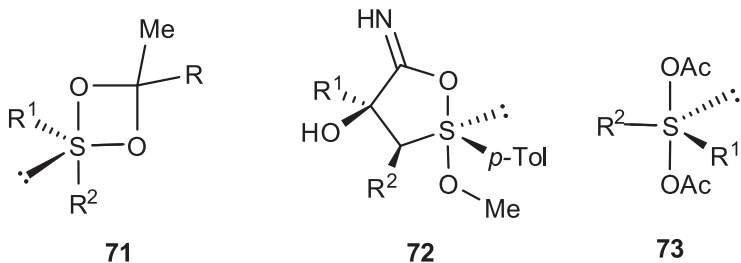
Struktura dioksasulfuranu **71** (Rys. 4) została zaproponowana jako produkt pośredni w reakcji utleniania alkilowych i arylowych sulfidów do sulfonów za pomocą dioksyranów [33–35].



Schemat 28
Scheme 28

Opisywana wcześniej hydroliza grupy nitrylowej β -cyjanosulfotlenków (patrz: Schemat 26) biegła przez oksaoksulfuran 72 (Rys. 4) prowadząc do odpowiednich β -sulfinylo- α -hydroksyamidów, jeśli reakcja była prowadzona w metanolu jako rozpuszczalniku.²⁹

Niejednokrotnie wykazano, że w reakcjach typu Pummerera produktem pośrednim są odpowiednie struktury sulfuranowe. I tak, w indukowanych bezwodnikiem octowym reakcjach Pummerera lub typu Pummerera optycznie czynnych związków sulfinylowych jako produkt pośredni sugerowano diacetyloksysulfuran 73 (Rys. 4).^{36,37,38}

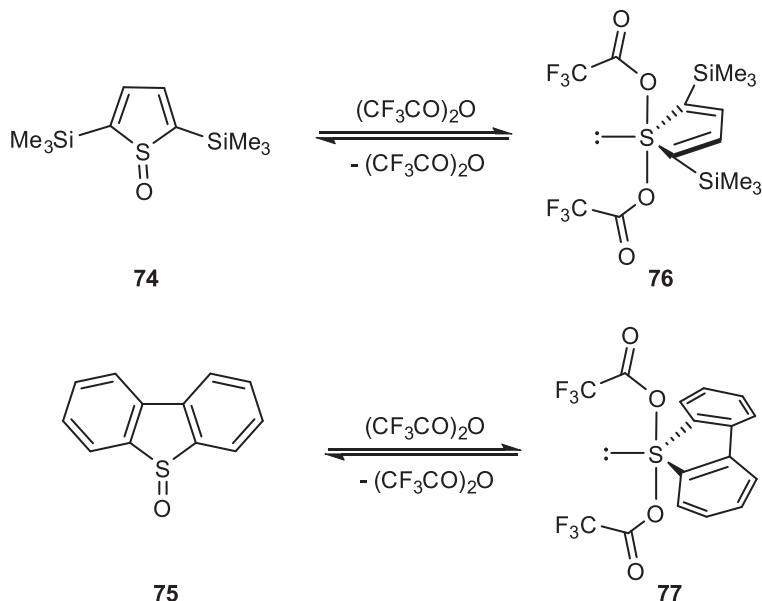


Rysunek 4
Figure 4

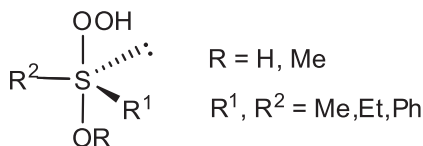
W podobnego typu reakcjach cyklicznych sulfotlenków 74 i 75 z bezwodnikiem trifluoroocetowym zaproponowano przejściowe tworzenie się pośrednich dioksulfuranów 76 i 77. Co więcej, na podstawie eksperymentów ^1H , ^{13}C i ^{19}F NMR w niskich temperaturach (od -90 do -60°C) udowodniono istnienie równowagi między strukturami sulfotlenkowymi a sulfuranowymi (Schemat 29) [39].

Badając reakcje fotoutleniania symetrycznych i niesymetrycznych sulfidów do odpowiednich sulfotlenków i sulfonów stwierdzono, że w przypadku prowadzenia

tych procesów w metanolu jako rozpuszczalniku kluczowymi produktami pośrednimi są sulfurany **78** (Rys. 5), z apikalnym podstawnikiem nadtlenkowym [40–44].



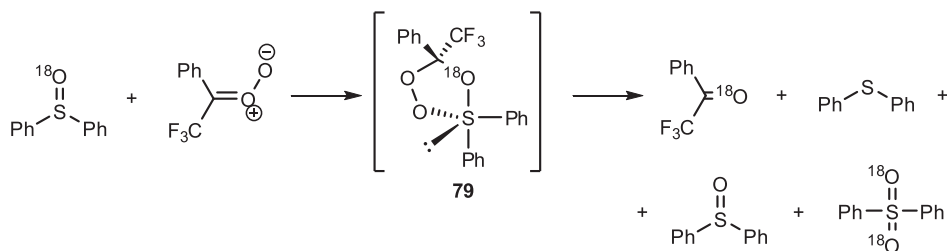
Schemat 29
Scheme 29



78

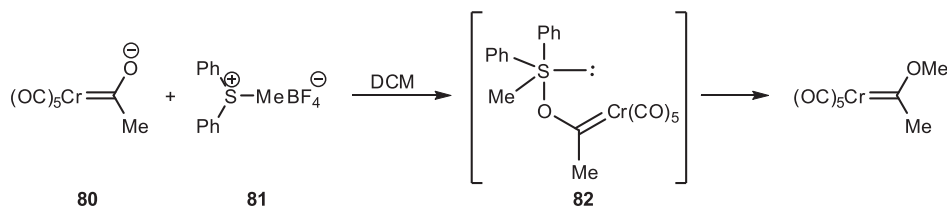
Rysunek 5
Figure 5

W przypadku reakcji znaczonego izotopem ^{18}O sulfotlenku difenyłowego z tlenkiem α,α,α -trifluoroacetofenonu prowadzącej do tworzenia ketonu trifluorometylofenyłowego, sulfidu dimetyłowego, sulfonu difenyłowego oraz sulfotlenku difenyłowego wolnego od izotopu ^{18}O przyjęto, że produktem przejściowym był monocykliczny sulfuran **79** z „ekwatorialnym podstawnikiem nadtlenkowym” (Schemat 30) [45].



Schemat 30
Scheme 30

Analizując przebieg reakcji alkilowania anionu **80** solami alkilodifenylosulfoniowymi **81** w dichlorometanie jako rozpuszczalniku wysnuto wniosek, że produktem pośrednim musiał być tu sulfuran **82** posiadający trzy wiązania S-C (Schemat 31) [46].



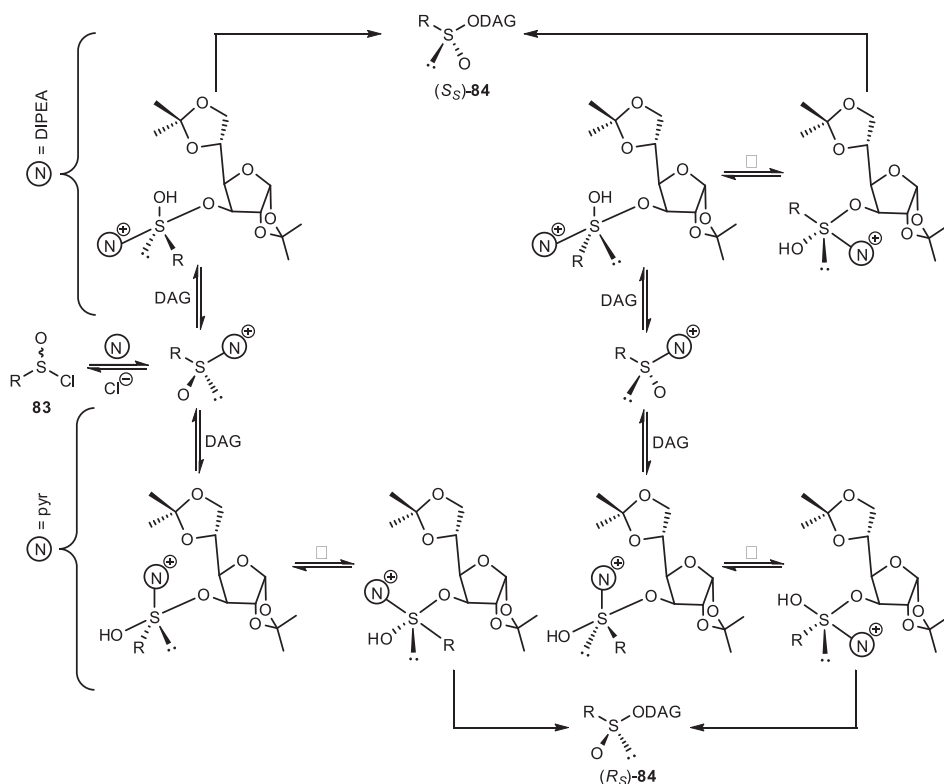
Schemat 31
Scheme 31

W reakcji kondensacji racemicznych chlorosulfinylo- (**83**) [47, 48], jak również di(chlorosulfinylo)alkanów [49, 50] z czynnym optycznie alkoholem – diaceton-*D*-glukozą (DAG) otrzymywano czyste optycznie sulfiny (R_S)-**84** i (S_S)-**84**. Co interesujące, obydwa diastereoizomery otrzymano używając różnych amin jako czynników kondensujących: stosując diizopropyletyloaminę otrzymano (S_S)-**84**, natomiast użycie pirydyny dostarczyło (R_S)-**84**. Takie rezultaty autorzy tłumaczą tworzeniem odpowiednich azodioksosulfuranów i procesami ich pseudorotacji (Schemat 32) [47].

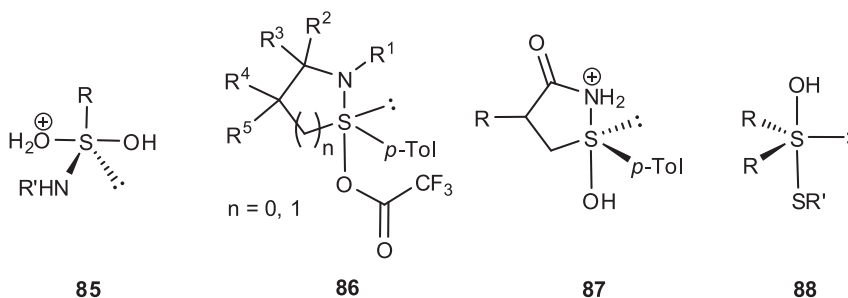
Zasugerowano również, że dioksyzasulfuran **85** (Rys. 6) był produktem przejściowym w prowadzącej do odpowiednich kwasów sulfonowych i amin pierwszorzędowych reakcji kwasowej hydrolizy *N*-podstawionych sulfonamidów. Mechanizm ten potwierdzono używając związków znaczonego izotopem ¹⁸O [51].

Obecność zawierających cztero- [52–55] lub pięcioczłonowe [56] pierścienie azooksosulfuranów **86** (Rys. 6) jako produktów pośrednich zaproponowano dla indukowanej kwasem trifluoroctowym, nieoksydatywnej reakcji Pummerera β- lub γ-aminosulfotlenków, prowadzącej do odpowiednich trifluoroctanów.

Sulfuranowe związki przejściowe **87** zaproponowano dla reakcji przekształcenia β-cyjanowinylosulfotlenków w odpowiednie cykliczne sulfiniminy (Rys. 6) [57].



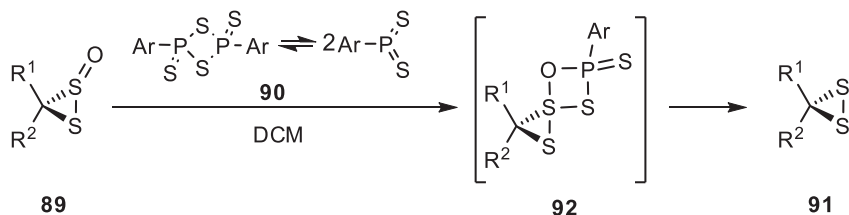
Schemat 32
Scheme 32



Rysunek 6
Figure 6

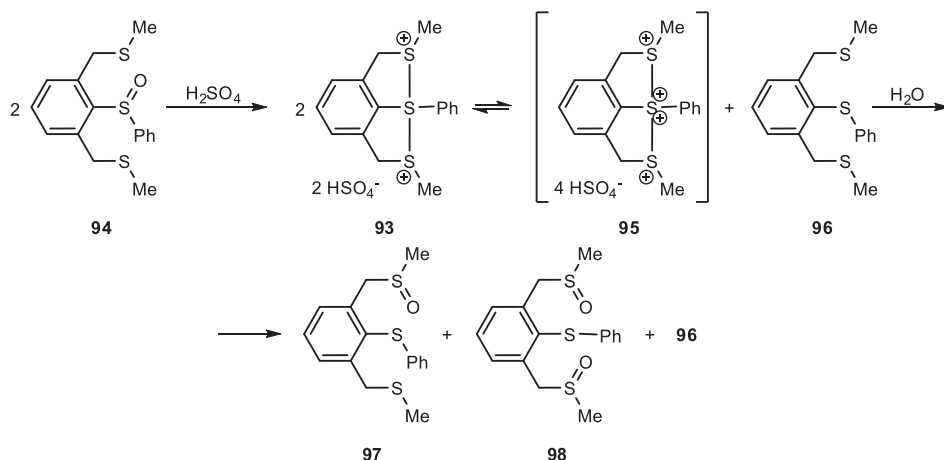
Z kolei tworzenie oksytiosulfuranów **88** (Rys. 6) posiadających apikalną grupę alkilosulfanową zaproponowano, aby wyjaśnić przebieg reakcji redukcji sulfotlenków przy użyciu tioli. Tworzące się sulfurany ulegały natychmiastowemu atakowi drugiej cząsteczki tioli, co prowadziło, odpowiednio, do sulfidu R_2S i disulfidu $RSSR$ [58].

Dla reakcji redukcji S-tlenków ditiarnów **89** odczynnikiem Lawessona **90** prowadzącej do odpowiednich ditiarnów **91** przyjęto udział pośredniego oksydiosulfuranu **92** (Schemat 33) [59].



Schemat 33
Scheme 33

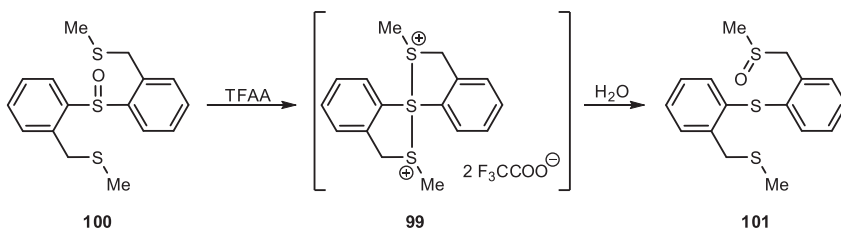
Wykorzystując techniki NMR zaobserwowano też istnienie przejściowego sulfuranu **93**, powstającego po potraktowaniu sulfotlenku(2,6-bismetylotiometylo) fenylo- fenyloвого **94** kwasem siarkowym(VI). Autorzy wykazali, że sulfuran ten, zawierający dwa apikalne ligandy sulfoniowe, ulegał odwracalnemu dysproporcjonowaniu do mieszaniny odpowiedniego tetrakationu **95** i trisulfidu **96**. Mieszanina ta po dodaniu wody dała monosulfotlenek **97** i bis-sulfotlenek **98** oraz trisulfid **96** (Schemat 34) [60].



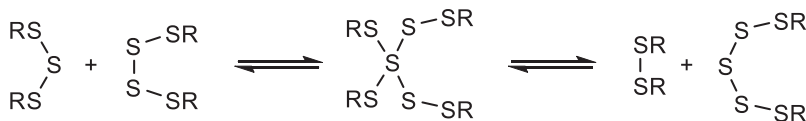
Schemat 34
Scheme 34

Tworzenie analogicznego sulfuranu **99** przyjęto, aby wyjaśnić tworzenie się tylko jednego produktu **101** w reakcji 1,5-migracji atomu tlenu w sulfotlenku **100** po potraktowaniu go bezwodnikiem octowym (Schemat 35) [60].

Interesujący tetratosulfuran **102** zaproponowano jako produkt pośredni reakcji interkonwersji odpowiednich symetrycznych tri- i tetrasulfidów. Jego rozpad prowadził do utworzenia mieszaniny di- i pentasulfidów (Schemat 36) [61].



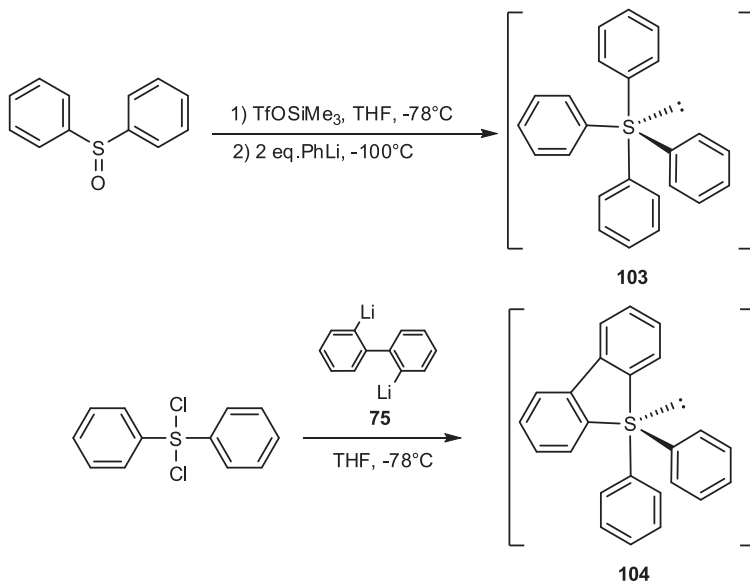
Schemat 35
Scheme 35



102

Schemat 36
Scheme 36

Próbowano także wyizolować tetrafenylosulfuran **103** [6] oraz 2,2'-bifenylo-difenylosulfuran **104** [62, 63] (Schemat 37), jednak udało się tylko potwierdzić ich istnienie jako nietrwałych produktów pośrednich w oparciu o analizę widm ^1H , ^{13}C , HH- i CH-COSY NMR zmierzonych w niskich temperaturach [62, 63].

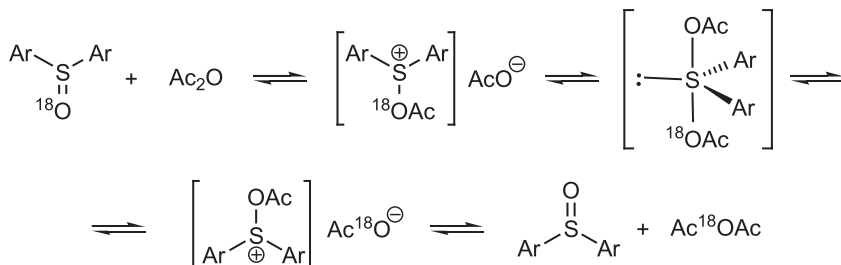


Schemat 37
Scheme 37

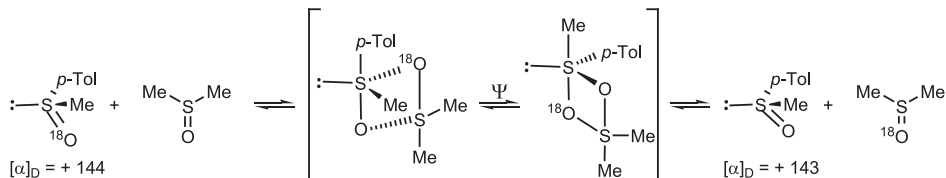
Analizując reaktywność połączeń 10-S-4 można wyróżnić dwie reakcje bardzo charakterystyczne dla tego typu związków:

- wymiana liganda (*ligand exchange*),
- sprzężenie ligandów (*ligand coupling*).

Reakcja wymiany liganda jest prawdopodobnie jedną z najlepiej poznanych reakcji związków hiperwalentnych. Przebiega z utworzeniem produktu pośredniego, jak w przypadku wymiany atomu tlenu przedstawionej na Schemacie 38 lub przez produkt pośredni ulegający najpierw pseudorotacji, a potem eliminacji grupy odchodzącej z utworzeniem produktu z retencją konfiguracji, co przedstawia Schemat 39 [64].

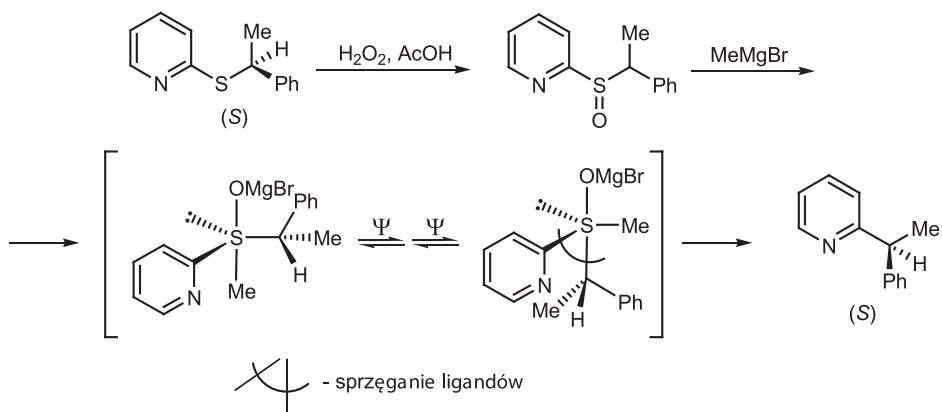


Schemat 38
Scheme 38



Schemat 39
Scheme 39

Proces sprzężenia ligandów jest reakcją uzgodnioną i zachodzi przez oddziaływanie orbitali liganda apikalnego i ekwatorialnego, a biorące w niej udział grupy zachowują swoją konfigurację absolutną na centrum stereogenicznym. Przykładem może być reakcja przedstawiona na Schemacie 40 [64].



Schemat 40
Scheme 40

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] *Chemistry of Hypervalent Compounds*, K.-ya Akiba (Ed.), Wiley-VCH, New York, 1999.
- [2] J. Drabowicz, G. Halaba, *Rev. Heteroatom Chem.*, 2000, **22**, 1.
- [3] K. Ohkata, M. Ohsugi, K. Yamamoto, M. Ohsawa, K.-ya Akiba, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 6355.
- [4] F. Iwasaki, S. Yoshida, S. Kakuma, T. Watanabe, M. Yasui, *J. Mol. Struct.*, 1995, **352/353**, 203.
- [5] N. Matsumura, J. Kawano, N. Fukunishi, H. Inoue, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 3623.
- [6] V.E. Pashinnik, *J. Fluorine Chem.*, 2002, **117**, 85.
- [7] J. Wessel, U. Behrens, E. Lork, P.G. Watson, M. Schrotter, R. Mews, *Inorg. Chem.*, 1999, **38**, 4789.
- [8] M.A. Clark, B.K. Goering, J. Li, B. Ganem, *J. Org. Chem.*, 2000, **65**, 4058.
- [9] K.-y. Akiba, K. Takee, Y. Shimizu, K. Ohkata, *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, **108**, 6320.
- [10] A.K. Datta, P.D. Livant, *J. Org. Chem.*, 1983, **48**, 2447.
- [11] T.M. Balthazor, J.C. Martin, *J. Am. Chem. Soc.*, 1975, **97**, 5634.
- [12] J. Zhang, S. Saito, T. Koizumi, *J. Org. Chem.*, 1998, **63**, 5265.
- [13] J. Zhang, T. Takahashi, T. Koizumi, *Heterocycles*, 1997, **44**, 325.
- [14] G.E. Wilson, Jr., B.A. Belkind, *J. Org. Chem.*, 1977, **42**, 765.
- [15] E.F. Perozzi, R.S. Michalak, G.D. Figuly, W.H. Stevenson III, D.B. Dess, M.R. Ross, J.C. Martin, *J. Org. Chem.*, 1981, **46**, 1049.
- [16] J. Zhang, S. Saito, T. Koizumi, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 1631.
- [17] J. Zhang, S. Saito, T. Koizumi, *J. Org. Chem.*, 1998, **63**, 9375.
- [18] D. Szabó, S. Szendeffy, I. Kapovits, A. Kucsman, M. Czugler, A. Kálmán, P. Nagy, *Tetrahedron: Asymm.*, 1997, **8**, 2411.
- [19] D. Szabó, J. Varga, A. Csámpaib, I. Kapovits, *Tetrahedron: Asymm.*, 2000, **11**, 1303.
- [20] Z.-C. Ho, P. Livant, W.B. Lott, T.R. Webb, *J. Org. Chem.*, 1999, **64**, 8226.
- [21] S.F. Hornbuckle, P. Livant, T.R. Webb, *J. Org. Chem.*, 1996, **60**, 4153.
- [22] a) T. Kawashima, *Coord. Chem. Rev.*, 2003, **244**, 137; b) T. Kawashima, F. Ohno, R. Okazaki, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1994, **33**, 2094.
- [23] A. Touchkine, E.L. Clennan, *J. Org. Chem.*, 1999, **64**, 5620.

- [24] a) G.K.S. Prakash, A.K. Yudin, *Chem. Rev.*, 1997, **97**, 757; b) N.R. Patel, R.L. Kirchmeier, *Inorg. Chem.*, 1992, **31**, 2537.
- [25] D. Szabó, M. Kuti, I. Kapovits, J. Rábai, Á. Gy. Argay, M. Czugler, A. Kálmán, L. Pákányi, *J. Mol. Struct.*, 1997, **415**, 1.
- [26] N. Kano, Y. Itoh, Y. Watanabe, S. Kusaka, T. Kawashima, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, **47**, 9430.
- [27] N. Furukawa S. Sato, *Heteroatom Chem.*, 2002, **13**, 406.
- [28] J.L.G. Ruano, A.M.M. Castro, J.H.R. Ramos, *Tetrahedron Lett.*, 1996, **37**, 4569.
- [29] J.L.G. Ruano, A.M.M. Castro, J.H.R. Ramos, A.C.R. Flamarique, *Tetrahedron: Asymm.*, 1997, **8**, 3503.
- [30] J.-F. Nicoud, M.Z. Cherkaoui, *Tetrahedron: Asymm.*, 1995, **6**, 1941.
- [31] A. Volonterio, P. Bravo, C. Pesentib, M. Zanda, *Tetrahedron Lett.*, 2001, **42**, 3985.
- [32] N. Pelloux-Léon, I. Gautier-Luneau, S. Wendt, Y. Vallée, *Tetrahedron: Asymm.*, 1996, **7**, 1007.
- [33] M.E. González-Núñez, R. Mello, J. Royo, J.V. Ríos, G. Asensio, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 9154.
- [34] M.E. González-Núñez, R. Mello, J. Royo, J.V. Ríos, G. Asensio, I. Monzó, F. Tomás, J.G. López, F.L. Ortiz, *J. Org. Chem.*, 2004, **69**, 9090.
- [35] G. Asensio, R. Mello, M.E. González-Núñez, *Tetrahedron Lett.*, 1996, **37**, 2299.
- [36] A.-H. Li, L.-X. Dai, *Chem. Rev.*, 1997, **97**, 2341.
- [37] N. Shibata, M. Matsugi, N. Kawano, S. Fukui, C. Fujimori, K. Gotanda, K. Murata, Y. Kita, *Tetrahedron: Asymm.*, 1997, **8**, 303.
- [38] Y. Nagao, S. Miyamoto, M. Miyamoto, H. Takeshige, K. Hayashi, S. Sano, M. Shiro, K. Yamaguchi, Y. Sei, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 9722.
- [39] S. Sato, S.-Z. Zhang, N. Furukawa, *Heteroatom Chem.*, 2001, **12**, 444.
- [40] E.L. Clennan, A. Greer, *J. Org. Chem.*, 1996, **61**, 4793.
- [41] N. Soggiua, H. Cardya, J.L.H. Jiwanb, I. Lerayc, J.P. Soumillionb, S. Lacombe, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 1999, **124**, 1.
- [42] E.L. Clennan, W. Zhou, J. Chan, *J. Org. Chem.*, 2002, **67**, 9368.
- [43] E.L. Clennan, G. Pan, *J. Org. Chem.*, 2003, **68**, 5174.
- [44] N. Sofikiti, C. Rabalakos, M. Stratakis, *Tetrahedron Lett.*, 2004, **45**, 1335.
- [45] T. Nojima, Y. Hirano, K. Ishiguro, Y. Sawaki, *J. Org. Chem.*, 1997, **62**, 2387.
- [46] H. Matsuyama, T. Nakamura, M. Iyoda, *J. Org. Chem.*, 2000, **65**, 4796.
- [47] I. Fernández, N. Khiar, J. M. Llera, F. Alcudia, *J. Org. Chem.*, 1992, **57**, 6789.
- [48] I. Fernández, N. Khiar, *Chem. Rev.*, 2003, **103**, 3651.
- [49] N. Khiar, F. Alcudia, J.-L. Espartero, L. Rodríguez, I. Fernández, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 7598.
- [50] N. Khiar, C.S. Araújo, F. Alcudia, I. Fernández, *J. Org. Chem.*, 2002, **67**, 345.
- [51] A.M. Piggott, P. Karuso, *Tetrahedron Lett.*, 2007, **48**, 7452.
- [52] J.L.G. Ruano, J. Alemán, M. del Prado, I. Fernández, *J. Org. Chem.*, 2004, **69**, 4454.
- [53] S.K. Bur, A. Padwa, *Chem. Rev.*, 2004, **104**, 2401.
- [54] P. Bravo, M. Zanda, C. Zappalá, *Tetrahedron Lett.*, 1996, **37**, 6005.
- [55] M. Crucianelli, P. Bravo, A. Arnone, E. Corradi, S.V. Meille, M. Zanda, *J. Org. Chem.*, 2000, **65**, 2965.
- [56] R. Sánchez-Obregón, F.S.B. Ortiz, E. Díaz, F. Yuste, F. Wallsa, J.L.G. Ruano, *Tetrahedron*, 2007, **63**, 10521.
- [57] J.L.G. Ruano, A.E. Gamboa, L. González Gutiérrez, A.M.M. Castro, J.H.R. Ramos, F. Yuste, *Org. Lett.*, 2000, **2**, 733.
- [58] S. Boschi-Muller, A. Gand, G. Branlant, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2008, **474**, 266.
- [59] A. Ishii, R. Yamashita, M. Saito, J. Nakayama, *J. Org. Chem.*, 2003, **68**, 1555.

- [60] a) V.G. Nenajdenko, N.E. Shevchenko, E.S. Balenkova, *Chem. Rev.*, 2003, **103**, 229; b) H. Fujihara, J.J. Chiu, N. Furukawa, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1986, 1359.
- [61] R. Steudel, *Chem. Rev.*, 2002, **102**, 3905.
- [62] S. Sato, O. Takahashi, N. Furukawa, *Coord. Chem. Rev.*, 1998, **176**, 483.
- [63] S. Sato, N. Furukawa, *Tetrahedron Lett.*, 1995, **36**, 2803.
- [64] S. Oae, Y. Uchida, *Acc. Chem. Res.*, 1991, **24**, 202.

Praca wpłynęła do Redakcji 23 lutego 2012

**NADTLENOAZOTYN – SILNY BIOLOGICZNY
UTLENIACZ**

PEROXYNITRITE A STRONG BIOLOGICAL OXIDANT

**Michał Bijak^{*}, Michał Błażej Ponczek, Joanna Saluk,
Marta Chabielska, Julita Stępnia, Paweł Nowak**

*Katedra Biochemii Ogólnej, Uniwersytet Łódzki,
ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź
^{*}e-mail: mbijak@biol.uni.lodz.pl*

Abstract

Wstęp

1. Powstawanie i ogólna charakterystyka nadtlenoazotynu
2. Prekursory nadtlenoazotynu
3. Reaktywność nadtlenoazotynu
4. Biologiczne działanie nadtlenoazotynu

Piśmiennictwo cytowane

mgr Michał Bijak w 2010 roku ukończył studia na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Badania prowadzone w ramach przygotowywania pracy magisterskiej zatytułowanej: „Ocena działania polifenolowych ekstraktów roślinnych na aktywność koagulacyjną osocza i trombiny” stały się podstawą jego dalszej działalności naukowej. Od 2010 roku jest doktorantem Studium Doktoranckiego Biochemiczno-Biofizycznego Uniwersytetu Łódzkiego. Pracę doktorską wykonuje w Katedrze Biochemii Ogólnej UŁ. Celem jego pracy jest zbadanie oddziaływania związków polifenolowych z enzymami kaskady krzepnięcia krwi.

dr Michał Ponczek urodzony w 1975 roku w Łodzi biochemik, bioinformatyk, obecnie adiunkt zatrudniony od 2008 w Katedrze Biochemii Ogólnej Uniwersytetu Łódzkiego. Finalista 39 i 40 Olimpiady Chemicznej w 1994 i 1995 roku. Studiował Medycynę. Ukończył studia magisterskie z biologii na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, a następnie Podyplomowe Studium z Informatyki oraz Doktoranckie Studium Biochemiczno-Biofizyczne na Uniwersytecie Łódzkim. Obronił doktorat z biochemii w 2007 roku. Przebywał w 2008 roku na 3 miesięcznym stażu podoktorskim na Uniwersytecie Kalifornijskim San Diego, ufundowanym przez Europejską Organizację Biologii Molekularnej. Jest autorem i współautorem 13 artykułów naukowych w języku angielskim i 5 prac poglądowych w języku polskim obejmujących zagadnienia związane z bioinformatyką, filogenetyką molekularną i biochemią układu hemostazy oraz stresem oksydacyjnym. Jego zainteresowania badawcze obejmują szczególnie zagadnienia związane z ewolucją białek.

dr Joanna Saluk od roku 2000 jest zatrudniona w Katedrze Biochemii Ogólnej Uniwersytetu Łódzkiego, gdzie obecnie pracuje na stanowisku adiunkta. W roku 2001 uzyskała stopień doktora na podstawie rozprawy zatytułowanej: „Zmiany aktywności biologicznej płytek krwi wywołane działaniem lipopolisacharydów *Proteus mirabilis*”. Jej naukowe zainteresowania koncentrują się wokół zagadnień związanych z rolą płytek krwi w rozwoju reakcji zapalnych, głównie na oddziaływaniu płytek z toksyną bakterii Gramujemnych. Drugi nurt prowadzonych przez nią badań to poszukiwanie aktywnych biologicznie związków naturalnych dostępnych w diecie, które mogłyby funkcjonować jako naturalne antyoksydanty egzogenne o właściwościach przeciwplatekoth. W roku 2010 została laureatką konkursu na stypendium habilitacyjne L'Oréal Polska dla Kobiet i Nauki przyznawane przy wsparciu Polskiego Komitetu ds. UNESCO.

Marta Chabielska, studentka dwuletnich uzupełniających studiów magisterskich na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska, na kierunku biologia, specjalność: biochemia. Obecnie wykonuje prace magisterską w Katedrze Biochemii Ogólnej UŁ, której celem jest zbadanie wybranych ekstraktów roślinnych (*Asteraceae*) jako potencjalnych antyoksydantów, chroniących układ hemostazy przed działaniem reaktywnych form tlenu i azotu.

mgr Julita Stępniak ukończyła studia na wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego; kierunek biologia (specjalność biochemia). Celem jej pracy magisterskiej było zbadanie wpływu nadtlenoazotynu na strukturę i lizę włókniaka.

dr hab. Paweł Nowak, prof. nadzw. UŁ, biochemik, specjalista w zakresie biochemii krzepnięcia krwi. Jest współautorem 48 prac doświadczalnych opublikowanych w czasopiśmie indeksowanych przez filadelfijski Instytut Informacji Naukowej, 1 podręcznika akademickiego i 5 prac przeglądowych. Rezultaty swoich badań prezentował na ponad 50 konferencjach krajowych i zagranicznych. W ciągu ostatnich 10 lat zasadniczy nurt Jego aktywności naukowej związany jest z wyjaśnieniem molekularnych mechanizmów zaburzeń w układzie hemostazy spowodowanych przez reaktywne formy tlenu i azotu, a w szczególności z badaniami zaburzeń funkcji płytek krwi, plazminogenu i fibrynogenu wywołanych przez nadtlenoazotyn.

ABSTRACT

As demonstrated in recent years, one of the major factors of oxidative stress, generated in the circulatory system, in both acute and chronic pathological conditions, is peroxynitrite (ONOO^-) [4]. Peroxynitrite is a strong biological oxidant and nitrating compound, generated *in vivo* from a rapid reaction of two relatively less reactive, but commonly found, of free radicals: nitrogen monoxide (NO) and superoxide (O_2^-) [8]. This reaction occurs spontaneously and is not catalyzed by any enzyme. A fundamental reaction of ONOO^- in biological systems is its fast reaction with carbon dioxide ($k = 5,7 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) and yields a short-lived intermediate, nitroperoxycarbonate (ONOOCO_2^-), which homolyzes leads to the formation of carbonate (CO_3^-) and nitrogen dioxide (NO_2) radicals (yield ~35%) [29, 30] (Fig. 1), which are one-electron oxidants. ONOO^- is responsible for oxidative modifications in a wide variety of biomolecules and is capable to induce of nitrative changes in sulfur and aromatic amino acids, especially 3-nitrotyrosine and dityrosine formation [17] (Fig. 2). This article describes the formation, reactivity and biological action of peroxynitrite.

Keywords: peroxynitrite, oxidative stress, 3-nitrotyrosine

Słowa kluczowe: nadtlendioazotyn, stres oksydacyjny, 3-nitrotyrozyna

WSTĘP

Jednym z nieodłącznych elementów tlenowego metabolizmu komórki jest generowanie reaktywnych form tlenu (RFT) i reaktywnych form azotu (RFA). Mogą to być zarówno jony, jak i związki bez ładunku elektrycznego, ze sparowanymi elektronami, jak również wolne rodniki, których cechą wspólną jest duża reaktywność. Źródłem RFT/RFA są produkty pośrednie utleniania przENOŚNIKÓW elektronów, związki generowane w czasie rozwoju reakcji zapalnych, peroksydacja lipidów oraz reakcje katalizowane przez oksydazy i jony metali (Fe^{3+} , Cu^{2+}) [1]. RFT i RFA stanowią ważny element procesów związanych z odpowiedzią immunologiczną, działają jako bezpośrednie czynniki bakteriobójcze (wybuch tlenowy fagocytów), a także uczestniczą w szlakach przekazywania sygnałów w komórkach [2]. Stan, w którym zostaje zaburzona równowaga pomiędzy szybkością powstawania RFT i RFA, a biologiczną zdolnością do szybkiej detekcji i unieczynnienia reaktywnych produktów pośrednich i/lub naprawy powstałych uszkodzeń przez układy antyoksydacyjne nosi nazwę stresu oksydacyjnego, który w skrajnych przypadkach może powodować nieodwracalne uszkodzenia komórek. Istotne znaczenie zaburzonej równowagi statusu oksydacyjnego zaobserwowano w wielu jednostkach chorobowych związanych z układem krążenia: między innymi w nadciśnieniu tętniczym, miażdżycy czy restenozie po zabiegach angioplastyki [3]. Wolnorodnikowe uszkodzenia białek, lipidów, węglowodanów oraz DNA stanowią jeden z głównych czynników etiopatologii wielu chorób [4]. Jak wykazano w ostatnich latach, jednym z głównych czynników stresu oksydacyjnego powstających w układzie krążenia w ostrych i przewlekłych stanach zapalnych oraz niedokrwienno-reperfuzyjnych jest nadtlENOAZOTYN [5,6]. NadtlENOAZOTYN (ONOO^-) jest silnym związkiem utleniającym i nitrującym, tworzonym przez komórki śródbłONKA, aktywowane makrofagii oraz neutrofile [7]. W ciągu ostatnich lat bardzo szybko wzrasta liczba publikacji związanych z określeniem fizjologicznej i patofizjologicznej roli nadtlENOAZOTYNU w organizmie, co świadczy o dużym zainteresowaniu tym czynnikiem stresu oksydacyjnego.

1. POWSTAWANIE I OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA NADTLENOAZOTYNU

Beckman i in. [8] w 1990 roku opisali reakcje powstawania nadtlENOAZOTYNU w warunkach *in vivo*. W układach biologicznych ONOO^- jest tworzony w wyniku reakcji dwóch stosunkowo mało reaktywnych, lecz powszechnie występujących wolnych rodników: anionorodnika ponadtlenkowego ($\text{O}_2^{\cdot-}$) i tlenku azotu (NO^{\cdot}). Reakcja ta zachodzi spontanicznie i nie jest katalizowana przez żaden enzym. Szybkości reakcji powstawania nadtlENOAZOTYNU jest około 3–8 razy większa niż rozkład anionorodnika ponadtlenkowego katalizowany przez dysmutazę ponadtlenkową (SOD) i wynosi $k = 6,7 \times 10^9 \text{ mol/l} \times \text{s}$ [9, 10]. W związku z tym, że obydwa prekursorzy nadtlENOAZOTYNU mają bardzo krótki okres półtrwania (NO^{\cdot} – 1–30 sekund; $\text{O}_2^{\cdot-}$

– milisekundy), nadlenoazotyn może powstawać w tym samym przedziale komórkowym przy jednoczesnym generowaniu jego prekursorów. Wewnątrz komórek stężenie rodnika tlenu azotu i anionorodnika ponadtlenkowego wynosi odpowiednio 10–100 nM i 0,1–1 nM, co jest niewystarczające, aby mogła zajść synteza nadlenoazotynu. Zupełnie odmienne warunki panują w pobliżu komórek generujących rodniki (np. komórki śródbłonna, aktywowane makrofagi, neutrofile), wtedy ich lokalne stężenie wzrasta aż do 1–10 μM [11]. Hydrofobowy tlenek azotu może przenikać swobodnie przez błony komórkowe, natomiast posiadający ładunek O_2^- jest zdolny przemieszczać się jedynie poprzez kanały jonowe. Dlatego powstawanie nadlenoazotynu w głównej mierze zależne jest od miejsca generowania anionorodnika ponadtlenkowego. Czas półtrwania nadlenoazotynu w warunkach biologicznych wynosi nieco mniej niż 1 s. Czas ten jest jednak na tyle wystarczająco długi aby związek ten mógł przenikać przez błony komórkowe, dyfundując na odległość jednej do dwóch średnic komórkowych (~5–20 μm), co oznacza, że wytwarzany w jednej komórce może mieć wpływ na inne, sąsiadujące komórki [7, 12, 13]. Ponadto nadlenoazotyn może przenikać przez błony biologiczne za pośrednictwem kanałów anionowych. ONOO^- znajduje się w stanie równowagi ze swoją uprotonowaną formą – kwasem nadlenoazotawym (ONOOH). W biologicznych warunkach stosunek ten zależny jest od lokalnego pH (w $\text{pH} = 7,4$ 80% nadlenoazotynu występować będzie w formie anionowej) [14].

Istnieje kilka laboratoryjnych metod syntezy nadlenoazotynu. Związek ten można otrzymać w reakcji tlenu azotu z nadtlenkiem tetrametyloamonowym lub nadtlenkiem potasu, jak również poprzez fotolizę i radiolizę azotanu, utlenianie hydroksyloaminy oraz utlenianie organicznych azotanów [15]. Do badań chemicznych powszechnie wykorzystuje się metodę szybkiej reakcji azotynu z nadtlenkiem wodoru w kwaśnym pH, gdzie medium jest zakwaszane kwasem solnym, azotowym lub siarkowym, a następnie szybko uzasadawiane [16]. Ten rodzaj syntezy jest bardzo szybki, wydajny i niekłopotliwy do przeprowadzenia, jednak pewien problem stanowi pozostałość H_2O_2 i efektywność jego usuwania z medium reakcyjnego. Do badań biologicznych powszechnie stosowaną jest metoda ozonowania roztworu azydku sodu opisana w 1995 roku przez Pryora i in. [17]. Metoda ta pozwala na uzyskiwanie preparatu nadlenoazotynu o niskiej sile jonowej, bez zanieczyszczeń nadtlenkiem wodoru, ze śladową ilością pozostałego azydku i o stosunkowo wysokim stężeniu (do 80 mM).

Nadtlenoazotyn, zaliczany do reaktywnych form azotu, nie jest wolnym rodnikiem. Niesparowane elektrony, które pochodzą od dwóch rodników – tlenu azotu i anionorodnika ponadtlenkowego formują w cząsteczce ONOO^- nowe wiązanie [18]. Nadlenoazotyn posiada dwa stany konformacyjne: *cis* i *trans*, a forma *cis* uważana jest za formę bardziej stabilną. Ma ona zdolność do przechodzenia w formę *trans* podczas rozpadu ONOO^- do azotanu [19].

2. PREKURSORY NADTLENOAZOTYNU

W warunkach fizjologicznych pewna część O_2 (ok. 1–5%) ulega w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym nie czteroelektronowej, a jednoelektronowej redukcji. W wyniku takiej redukcji powstaje anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$). Przemiana ta polega na przyłączeniu elektronu do cząsteczki tlenu i przekształceniu jej w wolny rodnik. Enzymami, które biorą udział w tej reakcji są dehydrogenaza NADH i koenzym Q [20].

Duże ilości $O_2^{\cdot-}$ są wytwarzane także przy udziale oksydazy NAD(P)H fagocytów, oksydazy ksantynowej czy lipooksygenazy 12/15 leukocytów – enzymu odpowiadającego za powstawanie kwasu 12(S)-hydroksyeikozatetraenowego (12(S)HETE) oraz kwasu 15(S)-hydroksyeikozatetraenowego (15(S)HETE) [2]. Anionorodnik ponadtlenkowy może także powstawać podczas metabolizmu ksenobiotyków w mikrosomach, w reakcji utleniania ksantyny do kwasu moczowego katalizowanej przez oksydazę ksantynową przy udziale reduktazy NADPH i cytochromu P-450. W wyniku zachodzącej w erytrocytach autooksydacji hemoglobiny do methemoglobiny powstaje 250×10^{15} cząsteczek anionorodnika ponadtlenkowego w ciągu doby [21, 22]. Źródłem $O_2^{\cdot-}$ mogą także być płytki krwi, w których obecna jest jedna z izoform oksydazy NAD(P)H, a także oksydaza ksantynowa czy cyklooksygenaza [23].

Anionorodnik ponadtlenkowy może zachowywać się zarówno jako utleniacz jak i reduktor, w zależności od charakteru substancji z jaką reaguje. Niskie stężenie anionorodnika ponadtlenkowego utrzymywane jest w układach biologicznych przez dysmutazę ponadtlenkową (SOD), która obecna jest w mitochondriach, cytoplazmie i przestrzeni międzykomórkowej. Enzym ten powoduje przemianę $O_2^{\cdot-}$ w mniej szkodliwy nadtlenek wodoru, który następnie ulega rozkładowi przez katalazę i peroksydazę [18, 24].

Tlenek azotu w temperaturze pokojowej jest bezbarwnym, trującym gazem [25]. Posiada jeden niesparowany elektron na atomie tlenu, stąd jego niestabilność i wysoka reaktywność. W powietrzu samorzutnie reaguje z tlenem tworząc ditlenek azotu (NO_2). Czas półtrwania ($t_{1/2}$) cząsteczki NO^{\cdot} wynosi 1–30 s [18, 24].

Tlenek azotu okazał się być bardzo ważną cząsteczką sygnałową w układach biologicznych. Furchgott i Zawadzki zaobserwowali w 1980 roku nieznanego wcześniej czynnik rozszerzający naczynia krwionośne, który nazwali śródbłonkowym czynnikiem relaksującym (EDRF) [26]. Siedem lat później odkryto, że opisywany jako EDRF, czynnik rozszerzający naczynia krwionośne, to właśnie tlenek azotu [27]. Odkrycie faktu, że tlenku azotu jest cząsteczką powodującą rozluźnianie ściany naczyń krwionośnych zaowocowało w 1998 roku przyznania w Nobla z dziedziny medycyny i fizjologii trzem naukowcom (Furchgott, Ignarro, Murad). Tlenek azotu powstaje z L-argininy przy udziale syntazy tlenku azotu (E.C. 1.14.13.39, ang. *nitric oxide synthase*, NOS) – enzymu o aktywności NADPH-zależnej dioksygenazy wprowadzającej dwa atomy tlenu do cząsteczki L-argininy. Reakcja przebiega dwuetapowo, związkiem pośrednim jest N^{ω} -hydroksy-L-arginina (NOH-L-Arg), a produk-

tami końcowymi $\cdot\text{NO}$ i L-cytrulina. Dodatkowo do zajścia reakcji konieczna jest obecność kofaktorów, tj.: FAD, FMN, tetrahydrobiopteryny oraz hemu [13, 28].

W ludzkim organizmie istnieją 3 izoformy syntazy tlenu azotu: neuronalna nNOS (typ I), indukowalna iNOS (typ II) i endotelialna (śródbłonkowa) eNOS (typ III). Izoforny NOS różnią się między sobą masą cząsteczkową, strukturą, miejscem występowania w komórce oraz kinetyką reakcji. Neuronalna i endotelialna NOS uważane są za enzymy konstytutywne, a jako kofaktorów wymagają jonów wapnia i kalmoduliny. Indukowalna NOS ulega ekspresji w makrofażach, neutrofilach, komórkach śródbłonna, fibroblastach, mięśniach gładkich naczyń krwionośnych, miocytach oraz hepatocytach, w odpowiedzi na cytokiny lub inne czynniki zapalne. Jej aktywność nie zależy od poziomu jonów wapnia. iNOS wytwarza tlenek azotu w 100–1000-krotnie wyższych ilościach niż formy konstytutywne [18, 22].

Tlenek azotu produkowany w komórkach śródbłonna w wyniku działania różnych bodźców (stres, trombina, ADP, serotonina, bradykinina, histamina) powoduje rozszerzanie naczyń krwionośnych i reguluje ciśnienie krwi. $\text{NO}\cdot$ hamuje nadmierną aktywację i agregację płytek krwi, co związane jest z jego działalnością przeciwzakrzepową i przeciwmiażdżycową. W mózgu i obwodowym układzie nerwowym, tlenek azotu pełni rolę neuroprzekaźnika. Uczestniczy on w procesie uczenia się i zapamiętywania, a także reguluje wydzielanie hormonów przysadki mózgowej [10, 29].

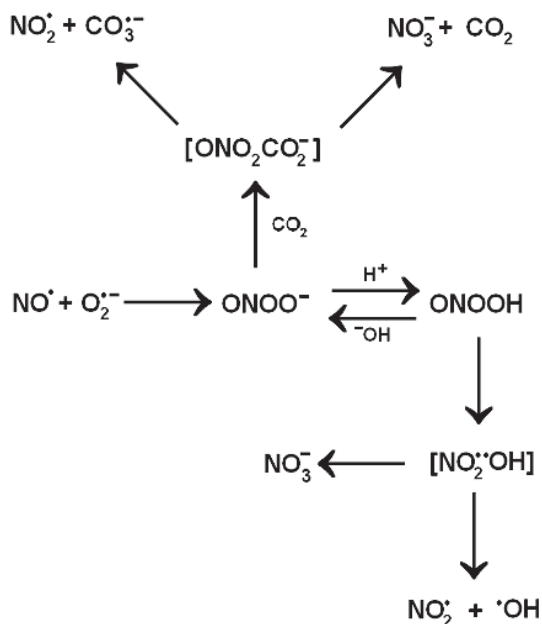
3. REAKTYWNOŚĆ NADTLENOAZOTYNU

Reakcje, w których uczestniczy nadtlendioazotyn można podzielić na: bezpośrednie reakcje redoks, reakcje z udziałem ditlenku węgla oraz reakcje związane z rozpadem sprzężonego z nadtlendioazotynem słabego kwasu – ONOOH . W tych pierwszych nadtlendioazotyn bierze udział w reakcjach jedno- lub dwu-elektronowego utleniania. Reakcja CO_2 z nadtlendioazotynem zachodzi z dużą szybkością ($k = 4,6 \times 10^4 - 5,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$; $\text{pH} = 7,4$, temp. 37°C) [30]. W wyniku tej przemiany powstaje nietrwały produkt pośredni – nitrozonadtlenowęglan (ONOOCO_2^-) ($t_{1/2} = 1 \mu\text{s}$), który ulega homolitycznemu rozpadowi dając ditlenek azotu (NO_2^\cdot) i rodnik węglanowy (CO_3^\cdot). Nitrozonadtlenowęglan może ulegać także izomeryzacji do $\text{O}_2\text{ONCO}_2^-$, a to prowadzi do odtworzenia ditlenku węgla oraz powstania azotanu (NO_3^-). Wtórne wolne rodniki (NO_2^\cdot i CO_3^\cdot), które powstają w reakcji między ditlenkiem węgla a nadtlendioazotynem przyczyniają się do aż 4-krotnego zwiększenia potencjału nitrującego ONOO^- [31]. Wydajność tworzenia rodników podczas rozpadu ONOOCO_2^- wydaje się być dyskusyjna. Większość autorów podaje, że addukt nadtlendioazotynu z CO_2 w około 65% rozpada się bezpośrednio do NO_3^- i CO_2 , natomiast w 35% do rodników CO_3^\cdot i $\cdot\text{NO}_2$ [7, 32, 33].

Trzeci rodzaj reakcji związany jest z powstawaniem rodnika hydroksylowego i rodnika ditlenku azotu podczas rozpadu kwasu nadtlendioazotowego [15]. Nadtlendioazotyn może ulegać protonacji ($\text{pK}_a = 6,8$), dając kwas nadtlendioazotawy [34, 35].

Uważa się, że cząsteczka ONOOH ulega homolizie z rozerwaniem wiązania O–O tworząc parę rodników – rodnik hydroksylowy ($\cdot\text{OH}$) i ditlenek azotu ($\cdot\text{NO}_2$) [7, 33, 36]. Wcześniej uważano, że ditlenek azotu obecny jest w organizmie jedynie po ekspozycji na dym papierosowy lub zanieczyszczenia powietrza [18].

Powstająca para rodnikowa $\cdot\text{OH}/\cdot\text{NO}_2$ zamknięta jest w swoistej klatce, otoczonej cząsteczkami wody i może dyfundować na zewnątrz klatki (zachodzi to w ok. 30% przypadków) lub rekombinować bezpośrednio do NO_3^- (takiej reakcji ulega około 70% par rodnikowych) [18, 33, 37]. Ze względu na wysokie stężenie ditlenku węgla w komórkach i płynach pozakomórkowych (1,3–1,5 mM, tj. około 10000 razy większe niż stężenie jonów wodorowych), jest on jednym z najważniejszych substratów dla nadtlenoazotynu [38]. Zatem najbardziej prawdopodobne jest, że nadtlenoazotyn w warunkach *in vivo* przereaguje właśnie z ditlenkiem węgla, niż ulegnie przekształceniu do HONOO, dając z kolei rodniki hydroksylowe.



Rysunek 1. Reakcje nadtlenoazotynu

Figure 1. Reaction of peroxynitrite

4. BIOLOGICZNE DZIAŁANIE NADTLENOAZOTYNU

Nadtlenoazotyn jest czynnikiem o szerokim spektrum działania w stosunku do biomolekuł. Biologiczne skutki modyfikacji oksydacyjnych wywołanych przez ONOO^- są liczne, ale ważne jest, aby pamiętać, że w dużym stopniu zależą one od stężenia tworzonego nadtlenoazotynu i jego komórkowej lokalizacji. Związek

ten i jego pochodne reagują zarówno z aminokwasami (m.in. tyrozyną, cysteiną, metioniną, tryptofanem), lipidami (fosfolipidy błon, lipoproteiny frakcji LDL), kwasami nukleinowymi, a także różnymi antyoksydantami. Nadtlenoazotyn powoduje tworzenie grup karbonylowych, dimeryzację, nitrowanie i nitrozylację aminokwasów, alkoholi, węglowodanów i związków tiolowych. Może działać jako jedno- lub dwuelektronowy utleniacz, z istotną rolą jonów metali przejściowych, spełniających funkcję katalizatorów. Jego aktywność, z jednej strony prowadzi do negatywnych następstw, takich jak utrata funkcji białek, a z drugiej, do powstawania związków będących donorami tlenu azotu, odgrywających rolę w rozkurczaniu naczyń krwionośnych [15].

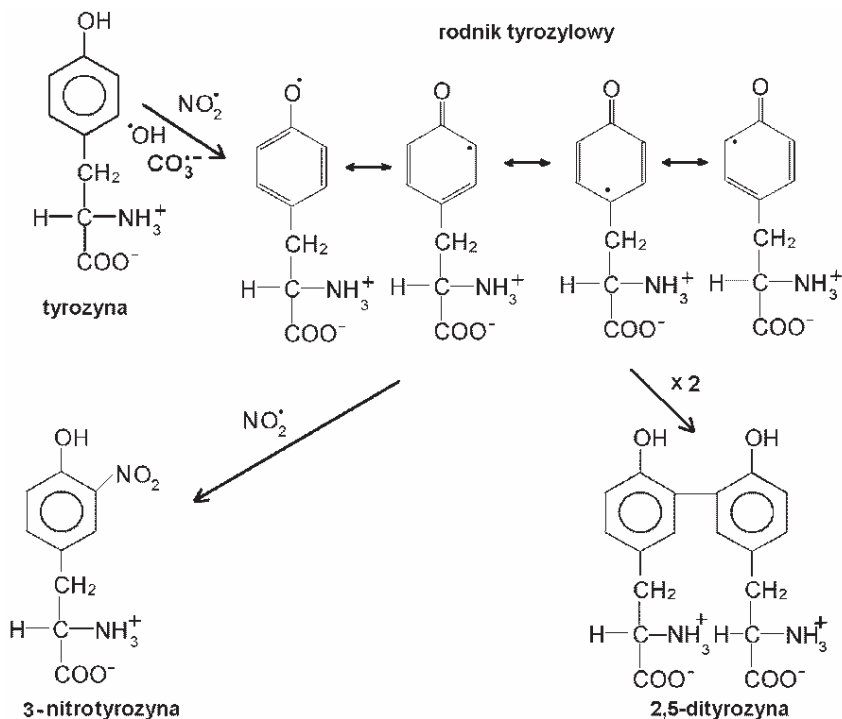
Liczne badania dowodzą, że powstający w naczyniach krwionośnych nadtlenoazotyn jest zarówno silnym oksydantem jak i czynnikiem nitrującym. Modyfikacje białek spowodowane działaniem nadtlenoazotynu powodują zmiany w strukturze i funkcji tych biomolekuł, których występowanie stwierdzono w wielu stanach chorobowych [39].

Nadtlenoazotyn wywołuje nitrowanie reszt aminokwasów alifatycznych takich jak: cysteina, metionina oraz aminokwasów aromatycznych: tryptofan i tyrozyna. Najbardziej podatne na utlenianie są aminokwasy siarkowe (cysteina, metionina), a także tyrozyna, tryptofan, fenyloalanina i histydyna [40]. Działanie nadtlenoazotynu na białka ma bardzo istotne znaczenie w modulowaniu funkcjonowania enzymów. Szczególnie narażone na działanie ONOO⁻ są grupy prostetyczne zawierające jony metali przejściowych bądź hem. W wyniku ich utleniania dochodzi do zahamowania aktywności enzymatycznej m.in. mieloperoksydazy, ceruloplazminy, dysmutazy ponadtlenkowej [38]. Wolne rodniki powstające w wyniku homolizy nadtlenoazotynu, bądź podczas jego reakcji z CO₂ (NO₂[•], OH[•], NO₂[•], CO₃^{•-}), również mają zdolność do oddziaływania z białkami, co prowadzi do ich modyfikacji. Utlenianie przez ONOO⁻ wolnych grup tiolowych prowadzi m.in. do zaburzenia funkcji enzymów zaangażowanych w metabolizm energetyczny komórki (dehydrogenazy bursztynianowej, reduktazy fumaranu) [10].

Szczególną uwagę należy zwrócić na udział nadtlenoazotynu w procesie nitrowania tyrozyny (Rys. 2). Nitrowanie tyrozyny prowadzi do kowalencyjnej modyfikacji białka w wyniku dodania grupy nitrowej (-NO₂) w sąsiedztwie grupy hydroksylowej w pierścieniu aromatycznym reszt tyrozynowych. Choć nadtlenoazotyn bezpośrednio nie może reagować z grupą fenolową, to produkty jego rozpadu – rodnik hydroksylowy i ditlenek azotu wykazują taką aktywność. Dodatkowo, nietrwały nitrozonadtlenowęglan (ONOOCO₂⁻), powstający w reakcji ONOO⁻ z CO₂, jest źródłem silnie reaktywnego rodnika węglanowego, który podobnie jak [•]OH może powodować tworzenie rodników tyrozylowych reagujących dalej z NO₂[•]. ONOOCO₂⁻ ma czas półtrwania krótszy niż 3 ms i reaguje z tyrozyną ze stałą reakcji większą od 2 × 10⁵ M⁻¹ s⁻¹ [41, 42]. Rodniki CO₃^{•-} reagują z resztą tyrozyny poprzez oderwanie wodoru od grupy hydroksylowej, natomiast w odróżnieniu od rodników [•]OH, nie przyłączają się do pierścienia aromatycznego. Dzięki temu, może powstawać więcej rodników tyrozylowych, oddziałujących następnie z [•]NO₂ do postaci

3-nitrotyrozyny. Co prawda rodniki $\cdot\text{NO}_2$ również reagują z resztą tyrozyny poprzez oderwanie atomu wodoru z grupy hydroksylowej, jednak stała szybkości tej reakcji jest 2–3 rzędy wielkości mniejsza od stałej szybkości reakcji rodników $\cdot\text{OH}$ czy $\text{CO}_3^{\cdot-}$ [43–45].

Wielu autorów uważa, że markerem działania nadtlenuazotynu w organizmie jest obecność znitrowanej tyrozyny w białkach. W osoczu osób zdrowych poziom 3-nitrotyrozyny jest stosunkowo niski ($< 0,1$ nmol/mg białka), ale znacząco wzrasta w przebiegu wielu chorób związanych z ostrym lub przewlekłym stanem zapalnym (posocznica, zespół ostrej niewydolności płuc, choroba niedokrwienna serca, chroniczna niewydolność nerek, reumatoidalne zapalenie stawów, cukrzyca, nowotwory płuc), a także u osób palących [46–49].



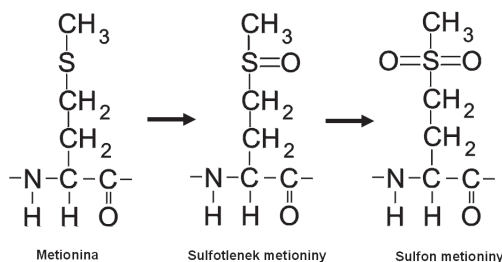
Rysunek 2. Powstawanie nitrotyrozyny i dityrozyny przy udziale nadtlenuazotynu

Figure 2. Formation of nitrotyrosine and dityrosine by peroxynitrite

Nadtlenoazotyn nie tylko silnie działa na tyrozinę, ale również na aminokwasy siarkowe (cysteinę i metioninę) [50]. W przypadku Cys ONOO^- jest odpowiedzialny za proces dwuelektronowego utleniania prowadzący do wytworzenia wiązań disiarczkowych, co może być ważnym mechanizmem inaktywacji wielu enzymów. W temperaturze pokojowej, w pH fizjologicznym nadtlenuazotyn utlenia grupy $-\text{SH}$ około 1000 razy szybciej niż nadtlenek wodoru. Reakcja ONOO^- z grupami tiolowymi przebiega z wytworzeniem produktów pośrednich, głównie S-nitrotioli

(RSNO₂) oraz niewielkich ilości S-nitrozotioili (RSNO). Te drugie są ważnym składnikiem metabolizmu tlenu azotu i odgrywają istotną rolę w przekształcaniu toksycznego ONOO⁻ do tlenu azotu [51].

Metionina jest utleniana przez nadtlenoazotyn [52], jak również przez inne reaktywne formy tlenu, takie jak nadtlenek wodoru, ozon, kwas chlorowy(I), do sulfotlenku metioniny (MeSOX) i dalej do sulfonu metioniny (Me₂SOX) (Rys. 3). *In vivo* działanie nadtlenoazotynu na metioninę ograniczone jest prawdopodobnie do dwuelektronowego utleniania jej do MeSOX. Powyższa reakcja zachodzi, jeśli w jej środowisku nie występuje ditlenek węgla. Utlenianie metioniny hamowane jest więc przez obecność ditlenku węgla, niezależnie od pH roztworu w przeciwieństwie do reakcji nitrowania tyrozyny. Nitrowanie tyrozyny i utlenianie metioniny, są zatem reakcjami konkurencyjnymi i zależą od dostępności ditlenku węgla [53, 54].



Rysunek 3. Proces wywołanego przez nadtlenoazotyn utleniania metioniny
Figure 3. The process of peroxynitrite-induced oxidation of methionine

Nadtlenoazotyn powoduje także modyfikację związków lipidowych: fosfolipidów błon, liposomów i lipoprotein [34]. Peroksydacja lipidów z udziałem ONOO⁻ polega na odłączeniu atomu wodoru od nienasyconych kwasów tłuszczowych. Nie jest przy tym wymagana obecność jonów metali przejściowych jako katalizatorów reakcji. Produktami utleniania lipidów są wodoronadtlenki lipidów, skoniugowane dieny i aldehydy. Produkty pośrednie peroksydacji (wodoronadtlenki lipidów, dialdehyd malonowy, izoprostany, 4-hydroksynonenal) mogą prowadzić do dalszych uszkodzeń oksydacyjnych w komórce. Utlenianie fosfolipidów oraz cholesterolu jest przyczyną zmian płynności i przepuszczalności błon komórkowych, co ma poważne konsekwencje dla prawidłowego funkcjonowania komórki. Utlenianie lipidów tworzących otoczkę mielinową neuronów prowadzi do demielinizacji i rozwoju chorób układu nerwowego [13, 18, 55]. Nitrowanie fosfolipidów błon wpływa na zaburzenie transdukcji sygnału w komórce [7].

Lipoproteiny o niskiej gęstości (LDL) są szczególnie podatne na utleniające i nitrujące działanie nadtlenoazotynu. Akumulacja utlenionego cholesterolu i LDL jest przyczyną rozwoju miażdżycy [56].

Nadtlenoazotyn jako silny związek utleniający i nitrujący jest w stanie wywoływać modyfikacje zasad azotowych. Spośród 4 zasad azotowych nukleotydów największą wrażliwość na jego toksyczne działanie wykazuje guanina. W wyniku

jej utleniania powstaje 8-oksoguanina, która następnie może zostać przekształcona do kwasu cyjanurowego i oksazolonu. W konsekwencji dochodzi do rozerwania pierścienia imidazolowego guaniny i powstania trwałej mutacji. Nadtlenoazotyn powoduje również nitrowanie guaniny, czego produktem jest 8-nitroguanina, traktowana jako specyficzny marker uszkodzeń DNA wywołanych przez ONOO⁻ [57, 58]. Nadtlenoazotyn poprzez swoje toksyczne działanie przyczynia się do powstawania jedno- i dwuniciowych pęknięć DNA. W wyniku odłączenia atomu wodoru od deoksyrybozy dochodzi do rozerwania pierścienia cukrowego i przerwania nici DNA. Powstawanie jednoniciowych pęknięć DNA spowodowanych działaniem ONOO⁻ obserwuje się głównie w pH zasadowym, podczas gdy liczba uszkodzeń w pH kwaśnym i obojętnym jest dużo niższa. Jednoniciowe pęknięcia DNA powstające na skutek uszkadzającego wpływu nadtlenoazotynu mogą nadmiernie aktywować jądrowy enzym – polimerazę poli(ADP-rybozy) (PARP), co w konsekwencji prowadzi do nekrotycznej śmierci komórki w warunkach stresu oksydacyjnego [59–61].

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] E.R. Stadtman, R.L. Levine, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2000, **899**, 191.
- [2] N.R. Madamanchi, A. Vendrov, M.S. Runge, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005, **25**, 29.
- [3] K.K. Griendling, G.A. FitzGerald, *Circulation*, 2003, **108**, 1912.
- [4] R. Radi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2004, **101**, 4003.
- [5] H. Ischiropoulos, L. Zhu, J.S. Beckman, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1992, **298**, 446.
- [6] D. Salvemini, S. Cuzzocrea, *Free Radic. Biol. Med.*, 2002, **33**, 1173.
- [7] C. Szabo, H. Ischiropoulos, R. Radi, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2007, **6**, 662.
- [8] J.S. Beckman, T.W. Beckman, J. Chen, P.A. Marshall, B.A. Freeman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1990, **87**, 1620.
- [9] P.C. Dedon, S.R. Tannenbaum, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2004, **423**, 12.
- [10] J.P. Kamat, *Indian J. Exp. Biol.* 2006, **44**, 436.
- [11] J.T. Groves, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1999, **3**, 226.
- [12] L. Liaudet, G. Vassalli, P. Pacher, *Front Biosci.*, 2009, **14**, 4809.
- [13] A. Denicola, R. Radi, *Toxicology*, 2005, **208**, 273.
- [14] R. Radi, G. Peluffo, M.N. Alvarez, M. Naviliat, A. Cayota, *Free Radic. Biol. Med.*, 2001, **30**, 463.
- [15] C. Ducrocq, B. Blanchard, B. Pignatelli, H. Ohshima, *Cell Mol. Life Sci.*, 1999, **55**, 1068.
- [16] J.S. Beckman, J. Chen, H. Ischiropoulos, J.P. Crow, *Methods Enzymol.* 1994, **233**, 229.
- [17] W.A. Pryor, G.L. Squadrito, *Am. J. Physiol.* 1995, **268**, 699.
- [18] P. Pacher, J.S. Beckman, L. Liaudet, *Physiol. Rev.*, 2007, **87**, 315.
- [19] M.C. Symons, *J. Inorg. Biochem.*, 2000, **78**, 299.
- [20] E. Potargowicz, E. Szerszenowicz, M. Staniszevska, D. Nowak, *Postepy Hig. Med. Dosw.*, 2005, **59**, 259.
- [21] A. Gendzwill, *Pol. Merkur. Lekarski*, 2007, **23**, 280.
- [22] R. Rutkowski, S.A. Pancewicz, K. Rutkowski, J. Rutkowska, *Pol. Merkur. Lekarski*, 2007, **23**, 131.
- [23] F. Krotz, H.Y. Sohn, U. Pohl, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004, **24**, 1988.
- [24] R.P. Patel, J. McAndrew, H. Sellak, C.R. White, H. Jo, B.A. Freeman, V.M. Darley-Usmar, *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, **1411**, 385.
- [25] H. Puzanowska-Tarasiewicz, L. Kuzmicka, M. Tarasiewicz, *Pol. Merkur. Lekarski*, 2009, **27**, 338.

- [26] R.F. Furchgott, J.V. Zawadzki, *Nature*, 1980, **288**, 373.
- [27] R.M. Palmer, A.G. Ferrige, S. Moncada, *Nature*, 1987, **327**, 524.
- [28] M.C. Carreras, J.J. Poderoso, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2007, **292**, 1569.
- [29] M. Mielczarek-Puta, A. Chrzanowska, W. Grabon, A. Baranczyk-Kuzma, *Postepy Hig. Med. Dosw.*, 2008, **62**, 214.
- [30] B. Alvarez, R. Radi, *Amino. Acids*, 2003, **25**, 295.
- [31] R. Meli, T. Nauser, P. Latal, W.H. Koppenol, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2002, **7**, 31.
- [32] O. Augusto, M.G. Bonini, A.M. Amanso, E. Linares, C.C. Santos, S.L. De Menezes, *Free Radic. Biol. Med.*, 2002, **32**, 841.
- [33] J. Zielonka, A. Sikora, J. Joseph, B. Kalyanaraman, *J. Biol. Chem.*, 2010, **285**, 14210.
- [34] R. Radi, J.S. Beckman, K.M. Bush, B.A. Freeman, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1991, **288**, 481.
- [35] H. Gunaydin, K.N. Houk, *Chem. Res. Toxicol.*, 2009, **22**, 894.
- [36] M.P. Jensen, D.P. Riley, *Inorg. Chem.*, 2002, **41**, 4788.
- [37] A. Korkmaz, S. Oter, M. Seyrek, T. Topal, *Interdiscip. Toxicol.*, 2009, **2**, 219.
- [38] G. Ferrer-Sueta, R. Radi, *ACS Chem. Biol.*, 2009, **4**, 161.
- [39] P. Nowak, B. Olas, B. Wachowicz, *Postepy Biochem.*, 2010, **56**, 239.
- [40] C. Szabo, *Toxicol. Lett.*, 2003, **140-141**, 105.
- [41] S.V. Lymar, Q. Jiang, J.K. Hurst, *Biochemistry*, 1996, **35**, 7855.
- [42] S. Zhu, K.F. Basiouny, J.P. Crow, S. Matalon, *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.*, 2000, **278**, 1025.
- [43] J.M. Souza, G. Peluffo, R. Radi, *Free Radic. Biol. Med.*, 2008, **45**, 357.
- [44] L. Gebicka, J. Didik, *Postepy Biochem.*, 2010, **56**, 103.
- [45] S. Bartesaghi, G. Ferrer-Sueta, G. Peluffo, V. Valez, H. Zhang, B. Kalyanaraman, R. Radi, *Amino. Acids*, 2007, **32**, 501.
- [46] C. Vadseth, J.M. Souza, L. Thomson, A. Seagraves, C. Nagaswami, T. Scheiner, J. Torbet, G. Vilaire, J.S. Bennett, J.C. Murciano, V. Muzykantov, M.S. Penn, S.L. Hazen, J.W. Weisel, H. Ischiropoulos, *J. Biol. Chem.*, 2004, **279**, 8820.
- [47] B. Pignatelli, C.Q. Li, P. Boffetta, Q. Chen, W. Ahrens, F. Nyberg, A. Mukeria, I. Bruske-Hohlfeld, C. Fortes, V. Constantinescu, H. Ischiropoulos, H. Ohshima, *Cancer Res.*, 2001, **61**, 778.
- [48] N.W. Kooy, J.A. Royall, Y.Z. Ye, D.R. Kelly, J.S. Beckman, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1995, **151**, 1250.
- [49] B. Lipinski, *J. Diabetes Complications*, 2001, **15**, 203.
- [50] B. Alvarez, G. Ferrer-Sueta, B.A. Freeman, R. Radi, *J. Biol. Chem.*, 1999, **274**, 842.
- [51] A. van der Vliet, P.A. Hoen, P.S. Wong, A. Bast, C.E. Cross, *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, 30255.
- [52] W.A. Pryor, X. Jin, G.L. Squadrito, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1994, **91**, 11173.
- [53] B.S. Berlett, R.L. Levine, E.R. Stadtman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1998, **95**, 2784.
- [54] M. Tien, B.S. Berlett, R.L. Levine, P.B. Chock, E.R. Stadtman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1999, **96**, 7809.
- [55] R.G. Brannan, E.A. Decker, *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**, 3074.
- [56] H. Botti, A. Trostchansky, C. Batthyany, H. Rubbo, *IUBMB. Life*, 2005, **57**, 407.
- [57] T. Douki, J. Cadet, *Free Radic. Res.*, 1996, **24**, 369.
- [58] V. Yermilov, J. Rubio, H. Ohshima, *FEBS Lett.*, 1995, **376**, 207.
- [59] H. Ohshima, L. Virag, J. Souza, V. Yermilov, B. Pignatelli, M. Masuda, C. Szabo, *Methods Mol. Biol.*, 2002, **186**, 77.
- [60] C. Szabo, H. Ohshima, *Nitric. Oxide.*, 1997, **1**, 373.
- [61] C. Szabo, *Free Radic. Biol. Med.*, 1996, **21**, 855.

**CHEMICZNE ASPEKTY CELOWANEJ TERAPII
PRZECIWNOWOTWOROWEJ
II. POŁĄCZENIA NOŚNIK-LEK**

**CHEMICAL ASPECTS OF TARGETED
ANTICANCER THERAPY
II. BOND OF CARRIER TO DRUG**

**Karolina M. Werengowska¹, Marek Wiśniewski¹,
Artur P. Terzyk^{1*}, Natalia Gurtowska²,
Tomasz A. Drewa², Joanna Olkowska²**

¹ *Wydział Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu,
Katedra Chemii Materiałów, Adsorpcji i Katalizy,
Zespół Fizykochemii Materiałów Węglowych,
ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń*

² *Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Bydgoszczy, Zakład Inżynierii Tkankowej,
ul. M. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz
e-mail: aterzyk@chem.uni.torun.pl

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Leki w terapii celowanej; 1.1. Paklitaksel; 1.2. Związki kompleksowe platyny; 1.3. Doksorubicyna
2. Połączenia nanonośnik-lek; 2.1. Lek wewnątrz nanonośnika; 2.2. Lek na zewnątrz nanonośnika; 2.2.1. Grupa estrowa; 2.2.2. Grupa *N*-acetylohydrazonu; 2.2.3. Grupa amidowa; 2.2.4. Grupa disiarczkowa; 2.2.5. Adsorpcja

Podsumowanie

Wnioski

Piśmiennictwo cytowane

Mgr Karolina M. Werengowska ukończyła studia w 2010 roku na Wydziale Chemii UMK w Toruniu. Od 2010 roku odbywa studia doktoranckie na Wydziale Chemii UMK. Pracę doktorską wykonuje pod kierunkiem prof. dr hab. A.P. Terzyka. Jest współautorką dwóch publikacji w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym oraz posterów prezentowanych na konferencjach. Jej główne zainteresowania naukowe koncentrują się wokół funkcjonalizacji nanorurek węglowych do celów biomedycznych (jako nośników leków) oraz syntezy i właściwości uporządkowanych materiałów węglowych.

Dr Marek Wiśniewski ukończył studia w roku 1998 na Wydziale Chemii UMK w Toruniu. Pracę doktorską (2003) pod tytułem *Filmy węglowe jako materiały modelowe w badaniach mechanizmu katalizycznej redukcji tlenku azotu(II) za pomocą amoniaku* wykonał pod kierunkiem prof. dr hab. J. Zawadzkiego (rozprawa została wyróżniona). Jest współautorem ponad trzydziestu publikacji w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym oraz ponad czterdziestu komunikatów konferencyjnych. Jego główne zainteresowania naukowe koncentrują się wokół kalorymetrii adsorpcyjnej oraz syntezy nowych materiałów węglowych.

Prof. dr hab. Artur P. Terzyk ukończył studia w roku 1991 na Wydziale Chemii UMK w Toruniu. Pracę doktorską (1995) pod tytułem *Kalorymetryczne badanie oddziaływań międzycząsteczkowych w układzie: adsorbat: mikroporowaty węgiel aktywny* wykonał pod kierunkiem prof. dr hab. G. Rychlickiego (rozprawa została wyróżniona). Jest stypendystą Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej (1996 rok). Rozprawę habilitacyjną *Węgle aktywne – nowoczesne metody charakteryzacji oraz zastosowanie do adsorpcji substancji biologicznie czynnych* obronił (z wyróżnieniem) w roku 2005. Rozprawa została wyróżniona także nagrodą Prezesa Rady Ministrów. Tytuł profesora zwyczajnego uzyskał w VII 2012 roku. Jest współautorem dwóch monografii: P.A. Gauden, A.P. Terzyk, *Zarys teorii adsorpcji par gazów w mikroporach materiałów węglowych*, WICHiR, Warszawa, 2002; Artur P. Terzyk, Piotr A. Gauden i P. Kowalczyk (Eds.), *Carbon Materials Theory and Practice*, Research Signpost, 2008. Od 2008 roku pełni funkcję kierownika zespołu Fizykochemii Materiałów Węglowych. Jest członkiem komitetu naukowego konferencji ISSHAC, współautorem 160 publikacji w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym oraz 100 komunikatów konferencyjnych. Jest promotorem dwóch rozpraw doktorskich. Jego główne zainteresowania naukowe koncentrują się wokół zagadnień związanych z adsorpcją z roztworów, kalorymetrią adsorpcji oraz teoretycznym opisem procesów sorpcji zachodzących na materiałach węglowych z zastosowaniem modeli analitycznych i symulacji komputerowych.

Mgr Natalia Gurtowska w 2009 r. ukończyła studia magisterskie na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy, kierunek – biotechnologia. W tym samym roku rozpoczęła studia doktoranckie z zakresu nauk medycznych. Rozprawę doktorską przygotowuje pod kierunkiem prof. dr hab. Gerarda Drewy. Wyniki pracy doktorantki zostały opublikowane w czasopiśmie naukowych mieszczących się na liście filadelfijskiej (6 publikacji) oraz zaprezentowane na kilku konferencjach naukowych w kraju i za granicą. Jest współautorem jednej monografii. Jej zainteresowania naukowe koncentrują się wokół poszukiwania nowych źródeł komórek macierzystych ze szczególnym uwzględnieniem tkanki tłuszczowej otrzymywanej podczas zabiegów liposukcji.

Dr hab. Tomasz Drewa, prof. UMK dyplom lekarza otrzymał w 1996 r. w Akademii Medycznej w Gdańsku. Od 1999 do 2009 roku pracował w Katedrze i Klinice Urologii Ogólnej, Onkologicznej i Dziecięcej CM UMK w Bydgoszczy, pod kierunkiem prof. Zbigniewa Wolskiego. Pracę doktorską z onkologii eksperymentalnej pod kierunkiem prof. Mariusza Wysockiego obronił na Wydziale Lekarskim Akademii Medycznej w Bydgoszczy, gdzie w 1999 roku otrzymał stopień naukowy doktora nauk medycznych. Dyplom specjalisty w dziedzinie urologii oraz tytuł Fellow of the European Board of Urology (FEBU) otrzymał w 2006 r., kierownikiem specjalizacji był prof. Zbigniew Wolski. W 2010 Rada Wydziału Lekarskiego CM UMK w Bydgoszczy przyznała mu tytuł doktora habilitowanego w dziedzinie medycyna – urologia, na podstawie pracy opisującej Jego dorobek naukowy, pt. „Hodowle komórek macierzystych, zróżnicowanych i ustalonych linii w wybranych chorobach układu moczowo-płciowego. Badania eksperymentalne”. Od 2010 r. pełni funkcję kierownika Zakładu Inżynierii Tkankowej CM UMK w Bydgoszczy. Od maja 2010 pracuje w Klinicznym Oddziale Urologii Onkologicznej, Centrum Onkologii w Bydgoszczy, gdzie zajmuje się nowoczesnymi technikami operacyjnymi i robotyką w urologii. Jest autorem lub współautorem ponad 240 prac naukowych. Przedstawił łącznie 37 doniesień na konferencjach międzynarodowych. Dr hab. Tomasz Drewa dwukrotnie otrzymał Nagrodę Naukową Polskiego Towarzystwa Urologicznego (2001 i 2004) oraz Nagrodę Naukową Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego (2007). Jego zainteresowania naukowe koncentrują się wokół roli enzymów lizosomalnych oraz prooksydacyjno-antyoksydacyjnych w przebiegu różnych chorób, onkologii eksperymentalnej oraz toksykologii *in vitro*, etiologii i leczenia chorób stercza, urologii rekonstrukcyjnej, regeneracji tkanek w chorobach skóry, eksperymentalnych rekonstrukcji narządów układu pokarmowego.

Mgr Joanna Olkowska w 2009 r. ukończyła studia magisterskie na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy, kierunek – biotechnologia, w specjalności biotechnologia medyczna. W tym samym roku rozpoczęła studia doktoranckie z zakresu nauk medycznych. Rozprawę doktorską przygotowuje pod kierunkiem dr hab. n. med. Aliny Woźniak. Wyniki pracy doktorantki zostały opublikowane w czasopiśmie naukowych mieszczących się na liście filadelfijskiej (5 publikacji) oraz zaprezentowane na kilku konferencjach naukowych w kraju i za granicą. Jest współautorem jednej monografii. Jej zainteresowania naukowe koncentrują się na poszukiwaniu nowych źródeł komórek macierzystych ze szczególnym uwzględnieniem źródeł płodowych, głównie płynu owodniowego otrzymywanego podczas zabiegów planowej amniopunkcji od kobiet ciężarnych.

ABSTRACT

Traditional anticancer therapy is usually low effective. Popular and common drugs applied in anticancer therapy are characterized by low solubility and nonspecific biodistribution in an organism. The chemotherapy kills not only cancer but also healthy cells [4]. Building of modern drug delivery systems based on nanocarriers is a new method of anticancer treatment. The present study is directed towards nanomaterials (as carbon nanotubes, liposomes, polymeric micelles) as modern drug carriers. Thus, we characterized mechanisms of actions of traditional chemotherapeutics: paclitaxel, cisplatin and doxorubicin (Figs. 3–5) [1, 15, 21]. The purpose of this study is a description of the bioconjugation of drug-nanocarrier. Chemotherapeutics can be connected to external or internal surfaces of nanocarriers (Fig. 6) [6]. We described two main methods of drug delivery from internal space of nanocarriers: nanoextraction and nanocondensation (Fig. 7) [32]. The type of drug-carrier bonding can be covalent or noncovalent. We report recent advances in the field showing the formation of esters (Figs. 10–11) [28, 29, 53, 54], acetylhydrazone (Fig. 12) [55–61], amides [62–64], and disulfides groups [12, 65]. These reactions depend on functional groups in structures of drugs and require suitable modification of nanocarrier surfaces. In practice, the functionalization of nanocarrier surface is associated with the covering with polymers including PEG, HPMA, PG and PLGA [3]. Adsorption is the most popular process of bonding chemotherapeutic and nanomaterials (Fig. 13) [66]. Special attention is paid to electrostatic interaction between drugs: paclitaxel [74], cisplatin [59, 76, 77], doxorubicin [67–73] and nanocarriers: carbon nanotubes and/or polymeric micells. By application of modern anticancer therapy, drugs are preserved from lysosomal degradation and to fast reaction in biological environment. Finally, nanocarriers improve adsorption of drug and increase concentration of drug only in cancer tissues [6, 7].

Keywords: drug nanocarriers, anticancer drugs, covalent bonds, adsorption

Słowa kluczowe: nanoosiłniki leków, leki przeciwnowotworowe, wiązania kowalencyjne, adsorpcja

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AcOH	– kwas octowy (ang. <i>acetic acid</i>)
CNT	– nanorurka węglowa (ang. <i>carbon nanotube</i>)
DDP	– cisplatyna (ang. <i>cisplatin</i>)
DMAP	– <i>N,N</i> -dimetyloaminopirydyna (ang. <i>N,N-dimethylaminopyridine</i>)
DMF	– dimetyloformamid (ang. <i>dimethylformamide</i>)
DMSO	– dimetylosulfotlenek (ang. <i>dimethyl sulfoxide</i>)
DOX	– doksorubicyna (ang. <i>doxorubicin</i>)
EDC	– 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl) karbodiimid (ang. <i>1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide</i>)
EDX	– rentgenowska spektroskopia z dyspersją energii (ang. <i>Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy</i>)
EELS	– spektroskopia traconej energii elektronu (ang. <i>Electron Energy-Loss Spectroscopy</i>)
EPR	– efekt zwiększonej przepuszczalności i retencji (ang. <i>enhanced permeability and retention</i>)
Fmoc–Osu	– 9-fluorenylometoksykarbonyl- <i>N</i> -hydroksysukcynimidu (ang. <i>9-fluorenylmethoxycarbonyl-N-hydroxysuccinimide</i>)
FTIR	– spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (ang. <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>)
GA	– bezwodnik glutarowy (ang. <i>glutaric anhydride</i>)
GEM	– chlorowodorek gemcytabiny (ang. <i>gemcitabini hydrochloridum</i>)
HMM	– heksametylmelamina (ang. <i>hexamethylmelamine</i>)
HPMA	– kopolimer <i>N</i> -(2-hydroksypropylo)metakryloamidu (ang. <i>N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymer</i>)
HR-TEM	– wysokorozdzielcza transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang. <i>High-Resolution Transmission Electron Microscopy</i>)
MWCNT	– wielościenne nanorurka węglowa (ang. <i>multi-walled carbon nanotube</i>)
mPEG	– metoksy-glikol polietylenowy (ang. <i>methoxy-polyethylene glycol</i>)
NHS	– <i>N</i> -hydroksysukcynimid (ang. <i>N-hydroxysuccinimide</i>)
PAGE	– poli(allil glicydyłu eter) (ang. <i>poly(allyl glycidyl ether)</i>)
PAMAM	– dendrymer poliamidoaminowy (ang. <i>polyamidoamine dendrimer</i>)
PBLA	– poli(β -benzylo- <i>L</i> -asparginian) (ang. <i>poly(β-benzyl-L-aspartate)</i>)

PEG	– glikol polietylenowy (ang. <i>polyethylene glycol</i>)
PG	– poli-L-kwas glutaminowy (ang. <i>poly(L-glutamic acid)</i>)
P-gp	– P-glikoproteiny (ang. <i>P-glycoprotein</i>)
PLA	– kwas polimlekowy (ang. <i>poly(lactic acid)</i>)
PLGA	– kwas poli(D,L-mlekowy-ko-glikolowy) (ang. <i>poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)</i>)
PPS	– poli(siarczek propylenu) (ang. <i>poly(propylene sulfide)</i>)
PTX	– paklitaksel (ang. <i>paclitaxel</i>)
PyBroP	– bromo-tris-pyrrolidinio-fosfoniowy heksafluorofosforan (ang. <i>bromo-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate</i>)
SWCNT	– jednościenne nanorurka węglowa (ang. <i>single-walled carbon nanotube</i>)
XPS	– spektroskopia fotoelektronów w zakresie promieniowania X (ang. <i>X-ray Photoelectron Spectroscopy</i>)

WPROWADZENIE

Nowotworem określa się zaburzenia proliferacji i funkcji komórek prowadzące do nieograniczonego wzrostu tkanki objętej procesem patologicznym. Komórki nowotworowe dzielą się szybciej niż komórki prawidłowe. Stosowana terapia przeciwnowotworowa obejmuje leczenie miejscowe, które oprócz leczenia chirurgicznego wykorzystuje techniki radioterapii, zamrażania lub waporyzacji tkanki bądź systemowe polegające na podawaniu chemioterapeutyków, antybiotyków, leków działających na układ immunologiczny. Celem leczenia jest niszczenie komórek nowotworowych wrażliwych na stosowane leki [1, 2]. Tradycyjne chemioterapeutyki wprowadzane są do organizmu drogą doustną bądź dożylną. Doustne podawanie leków (w postaci tabletek) skutkować może zaburzeniem profilu farmakokinetycznego leku i w konsekwencji powodować mniejsze lub większe niż wymagane stężenie chemioterapeutyku w danej tkance lub narządzie. Skuteczność tej metody jest niska i często związana z występowaniem skutków ubocznych [3].

Powszechnie dostępne leki charakteryzują się małą efektywnością związaną m.in. z ich ograniczoną rozpuszczalnością oraz słabą i niespecyficzną biodystrybucją w tkankach. W konsekwencji niszczą nie tylko patologiczne komórki, ale także uszkodzają prawidłowe [4]. Podąża się za udoskonaleniem technik leczenia. Nowe metody obejmują obszar tzw. nanomedycyny, w ramach której proponuje się dostarczanie chemioterapeutyków za pomocą nanocząstek (np. liposomów, miceli polimerowych, nanorurek węglowych). System taki okreśłany jest terminem: układ submikroskopijno koloidalny, który może zachowywać się jako:

- nośnik leków;
- nanosfera – matryca, gdzie lek ulega dyspersji;
- nanokapsułka – zbiornik, w którym chemioterapeutyk jest „uwięziony” w koronie hydrofobowo/hydrofilowej otoczonej membraną polimerową.

Od tego nowatorskiego sposobu dostarczania chemioterapeutyków oczekuje się przezwyciężenia licznych barier: hydrostatycznych, hydrofilowych (hydrofobowych), biofizycznych (biochemicznych) oraz oporności lekowej większości komórek nowotworowych [5].

Leki transportowane poprzez nanonośniki chronione są przed przedwczesną degradacją lizosomalną oraz zbyt szybką reakcją w biologicznym środowisku, co ogranicza występowanie skutków ubocznych. Charakteryzują się wydłużonym czasem cyrkulacji w układzie krwionośnym [6, 7]. Nanocząstki polepszają absorpcję chemioterapeutyku w tkance nowotworowej i jego wewnątrzkomórkową penetrację. Nanonośniki stosowane są też w celu zwiększenia miejscowego stężenia leku poprzez możliwość kontrolowania profilu farmakokinetycznego i dystrybucji chemioterapeutyku w organizmie [6].

Efektywność transportu leków za pomocą nośników bezpośrednio związana jest z rozmiarem materiału [8]. Małe rozmiary oraz mobilność nośników pozwalają na szybkie ich wnikanie do komórek nowotworowych poprzez charakterystyczne defekty naczyńniowe śródbłonna (o średnicy 100–1000 nm [8]) znajdujące się

w naczyniach krwionośnych zaopatrujących nowotwór. W konsekwencji lek łatwiej dostarczany jest do komórek nowotworowych i następuje polepszenie efektu zwiększonej przepuszczalności i retencji (EPR) [9]. Rozmiar nanonośników pozwala na efektywny wychwyty systemu dostarczania leków przez różne rodzaje komórek oraz selektywną akumulację w docelowym miejscu [10]. Nowoczesny układ transportu leków przeciwnowotworowych omija istniejące w organizmie bariery naturalne, tj. barierę krew-mózg, kapilary krążenia płucnego oraz system kapilar skórnych [8]. Nanonośniki z lekiem ($< 5 \mu\text{m}$), z powodzeniem mogą być podawane drogą dożylną, bowiem najmniejsze naczynia krwionośne w organizmie mają średnicę ok. 5–6 μm . Zastosowanie takiego systemu wyklucza ryzyko powstawania zatorów [10].

Zasadnicze znaczenie odgrywa także natura chemiczna powierzchni nośników. Właściwie, hydrofobowość determinuje stopień wiązania nanocząstki ze składnikami krwi. Wymagania dotyczące minimalizacji opsonizacji oraz wydłużenia czasu cyrkulacji w obiegu krwionośnym, nanonośniki spełniają po pokryciu ich powierzchni hydrofilowym polimerem, surfaktantem lub biodegradowalnym kopolimerem, np. politlenkiem etylenu (PEG), polioksamerem czy polisorbate 80 (Tween 80) [10].

Lek przenoszony za pomocą nanośników wychwytywany jest przez komórki, a następnie poddawany endocytozie, która może być wspomagana fagocytozą lub pinocytozą. Wówczas nie następuje efekt „szybkiego wypompowania” niewielkich cząsteczek leku z komórek w wyniku działania transbłonowej pompy lekowej (np. P-glikoproteiny), jak ma to miejsce podczas tradycyjnej terapii z użyciem niezwiązanych cząstek. Nanonośniki otaczane są przez błonę komórkową i następnie transportowane w okolice pęcherzyków endosomalnych. Dopiero wtedy ma miejsce uwalnianie chemioterapeutyku, z dala od błony komórkowej i jej pomp zależnych od ATP. Efekt ten wzmacnia oddziaływanie leku z komórką docelową [11, 12].

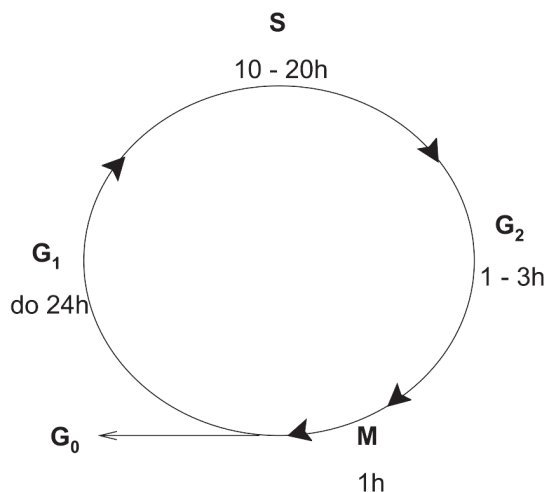
Szybkość uwalniania leku z nanonośnika zależna jest od wielu czynników, m.in. rozpuszczalności chemioterapeutyku, jego dyfuzji przez matrycę nośnika oraz możliwości erozji i degradacji systemu przenoszenia czynników przeciwnowotworowych. Zasadnicze znaczenie ma metoda włączenia leku do układu przenoszenia. Podczas gdy, między powierzchnią nanonośnika a chemioterapeutykiem powstają słabe wiązania, wówczas czynnik przeciwnowotworowy uwalniany jest stosunkowo szybko. Profil uwalniania chemioterapeutyku z systemów impregnowanych polimerem kontrolowany jest szybkością dyfuzji leku przez membranę polimerową. Dodatkowo, uwalnianie leków determinowane jest przez rozmiar nośnika. Mniejsze nanonośniki charakteryzują się dużym stosunkiem powierzchni właściwej do objętości oraz kumulacją leku bezpośrednio przy lub bardzo blisko powierzchni, co przyspiesza jego uwalnianie [10].

Nanonośnik usuwany jest z organizmu przez makrofagi systemu siateczkowo-śródbłonkowego, zazwyczaj nie dłużej niż w przeciągu godziny od podania leku. Dodatkowe pokrycie nanonośników rozpuszczalnymi polimerami, np. PEG wydłuża cyrkulację leku w krwi zmniejszając ich wychwyty przez makrofagi [7].

Wspomniany system z powodzeniem może zostać zastosowany w celowanej terapii przeciwnowotworowej, zgodnie z przesłankami literaturowymi przedstawionymi w pierwszej części pracy [13] poświęconej tematyce chemicznych połączeń nanoosznik-ligand. Niniejsza praca stanowi uzupełniającą część chemicznych aspektów celowanej terapii przeciwnowotworowej, opisując metody biokoniugacji leków przeciwnowotworowych do nanooszników, jako finalnego etapu syntezy układu ligand-nanoosznik-lek. Utworzony w ten sposób nowatorski system dostarczania leków przeciwnowotworowych wydaje się być najefektywniejszą metodą terapii, która pozwala na selektywny wychwyt komórek nowotworowych.

1. LEKI W TERAPII CELOWANEJ

Aktywność leków przeciwnowotworowych silnie związana jest z fazami cyklu komórkowego (Rys. 1 [14]). Chemioterapeutyki mogą wykazywać wzmożoną aktywność w stosunku do komórek nowotworowych bez względu na fazę cyklu życiowego (leki nieswoiste) bądź w jednej, konkretnej lub kilku fazach (leki swoiste). Komórki nowotworowe w fazie spoczynkowej (G_0) praktycznie w ogóle nie reagują na chemioterapeutyki ze względu na fakt, iż wówczas DNA komórki nie ulega replikacji. W fazie M cyklu komórkowego ma miejsce podział komórki, zaś fazy S, G_1 , G_2 składają się na interfazę, w której następuje wzrost komórki. Działanie leków przeciwnowotworowych w interfazie związane jest z ograniczeniem replikacji DNA (faza S) oraz zaburzeniami transkrypcji RNA (fazy S, G_1 , G_2)[14].

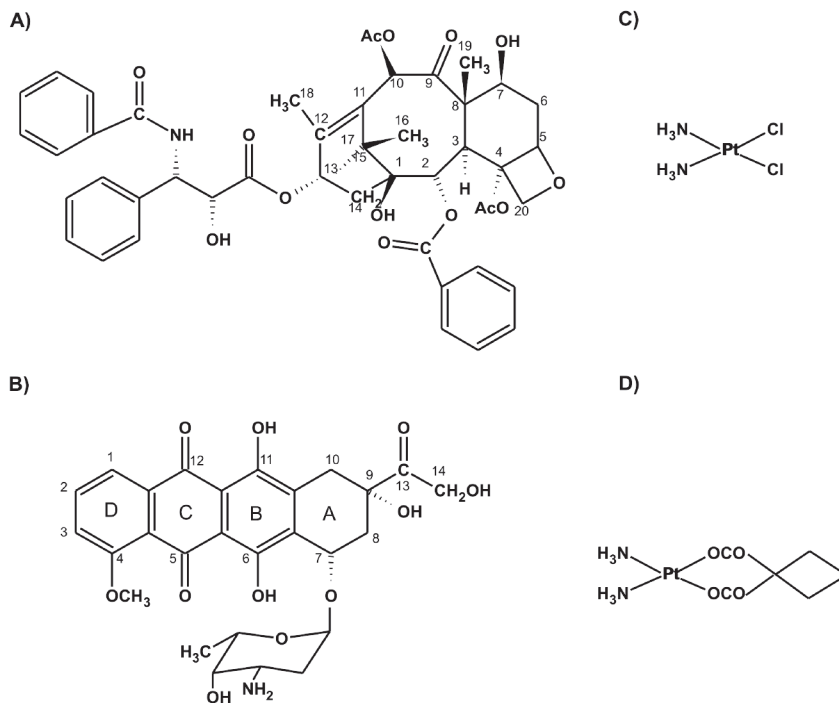


Rysunek 1. Fazy cyklu komórkowego (rysunek wykonany na podstawie [14])

Figure 1. Cell cycle phases (the figure based on [14])

Najczęściej stosowanymi lekami w systemowym leczeniu konwencjonalnym są: doksorubicyna [15], paklitaksel [16] oraz leki syntezowane na bazie platyny [17]

(Rys. 2). Rzadziej podawane są takie chemioterapeutyki jak: metotreksat [18] czy heksametylmelamina [19].



Rysunek 2. Chemiczna struktura leków: (A) paklitaksel, (B) dokсорubicyna, (C) cisplatyna, (D) karboplatyna (rysunki wykonane na podstawie [15–17])

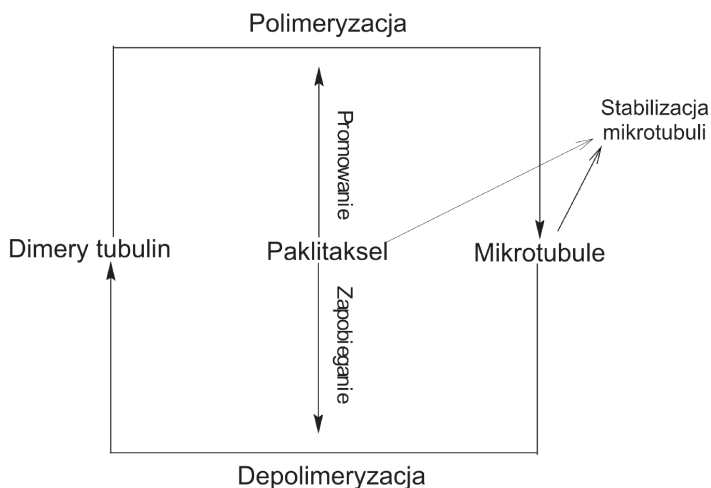
Figure 2. Drug chemical structures: (A) paclitaxel, (B) doxorubicin, (C) cisplatin, (D) carboplatin (figures based on [15–17])

1.1. PAKLITAKSEL

Paklitaksel należy do grupy diterpenoidów. Jego strukturalna nazwa to: $5\beta,20$ -epoksy- $1,2\alpha,4,7\beta,10\beta,13\alpha$ -heksahydroksytax- 11 -en- 9 -jeden, $4,10$ -dioctan- 2 -benzoesan 13 -ester z ($2R,3S$)- N -benzoilo- 3 -fenyloizoseryną (PTX). Paklitaksel otrzymuje się w sposób naturalny. Jest składnikiem ekstraktu z kory cisu. Związek jest wysoce lipofilowy i praktycznie nierozpuszczalny w wodzie. Głównie organiczne związki stanowią grupę rozpuszczalników paklitakselu: polioksyetylowany olej rycynowy EL (Cremophor EL), glikole polietylenowe, chloroform, aceton, etanol oraz metanol. Ze względu na fakt, iż paklitaksel wykazuje aktywność przeciwnowotworową, stosowany jest jako lek (Taxol) w postaci roztworu 50% Cremophor EL i 50% odwodnionego alkoholu. Właściwości lecznicze paklitakselu związane są z występowaniem w jego strukturze ośmioczłonowego pierścienia taksanowego, czteroczłonowego pierścienia oksetanowego oraz homochiralnego, estrowego łań-

cucha przy węglu C13. Dodatkowo, dostępna grupa hydroksylowa w pozycji 2' łańcucha estrowego polepsza aktywność terapeutyczną paklitakselu [1, 16].

Paklitaksel wpływa na polimeryzację dimerów tubulin bez konieczności hydrolyzy guanozylotryfosforanu (GTP). W wyniku reakcji powstają stabilne mikrotubule przy jednoczesnym hamowaniu procesu depolimeryzacji. Paklitaksel wiąże się z β -podjednostką tubulin w mikrotubulach głównie przez ugrupowania taksonowe. Ostatecznie, w wyniku zaburzenia naturalnej, dynamicznej równowagi pomiędzy procesami polimeryzacji i depolimeryzacji, ma miejsce śmierć komórek związana z zahamowaniem podziałów komórkowych [1, 2, 16]. Mechanizm działania paklitakselu schematycznie przedstawia Rys. 3 [1].



Rysunek 3. Mechanizm działania paklitakselu (rysunek wykonany na podstawie [1])

Figure 3. Mechanism of paclitaxel action (the figure based on [1])

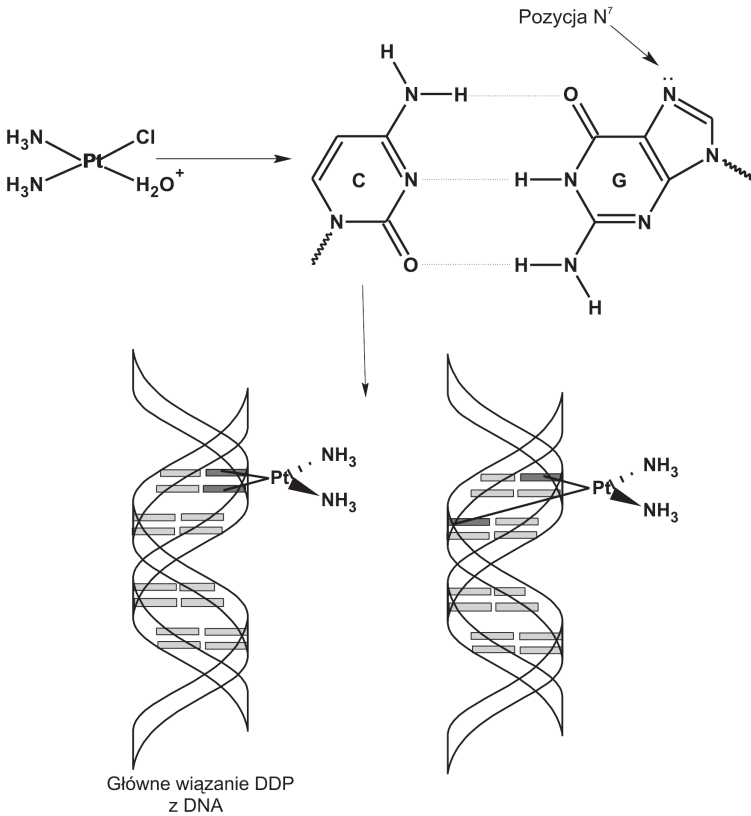
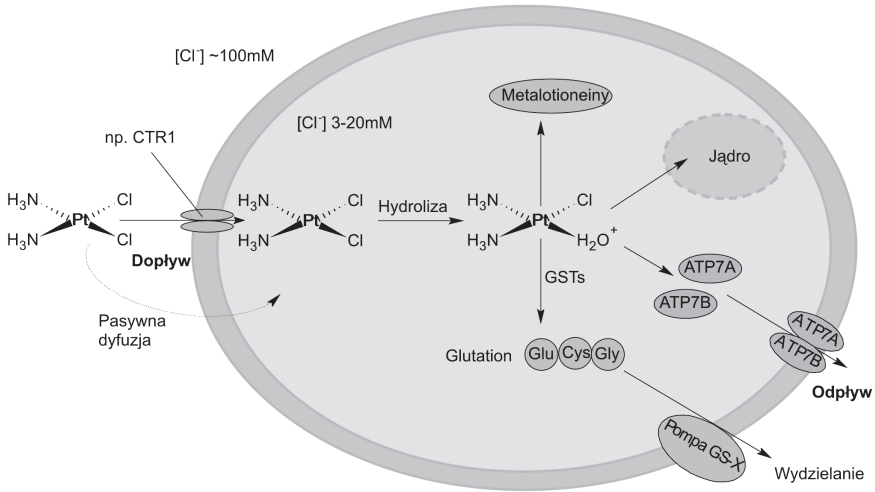
Paklitaksel zaliczany jest do leków wykazujących dwufazową aktywność, ponieważ wywołuje apoptozę komórek w fazie G_2 oraz M cyklu komórkowego [1, 20] (Rys. 1). Stosowany jest w leczeniu raków piersi, jajników, płuc oraz wielu innych nowotworów. Paklitaksel indukuje skutki uboczne, między innymi neurotoksyczność czy nefrotoksyczność. Toksyczność leku związana jest ze zbyt dużą zawartością oleju rycynowego. W konsekwencji, pacjentom przyjmującym lek na bazie paklitakselu podaje się sterydy oraz redukujące przeciwhistaminy [2, 20]. Obecnie trwają badania nad udoskonaleniem terapii z wykorzystaniem paklitakselu, a przede wszystkim nad zminimalizowaniem skutków ubocznych, które jej towarzyszą. Badania skupione są na nowych metodach dostarczania leku, które jednocześnie eliminowałyby potrzebę stosowania polioksyetylowanego oleju rycynowego EL oraz zwiększały stabilność chemioterapeutyku w organizmie. Alternatywą okazuje się być dostarczanie paklitakselu za pomocą nanonośników (patrz tekst dalej) [1].

1.2. ZWIĄZKI KOMPLEKSOWE PLATYNY

Związki kompleksowe platyny stanowią obszerną i ważną grupę leków stosowanych w tradycyjnej chemioterapii. Najpopularniejsze z nich to: cisplatyna oraz karboplatyna [21]. Właściwości lecznicze omawianych związków wynikają z ich specyficznej budowy. W strukturze występują cztery ligandy, dwa z nich odznaczają się charakterem obojętnym, zaś pozostałe są aktywne i muszą znajdować się w pozycji *cis*. Pod względem budowy chemicznej związki kompleksowe platyny należą do czynników alkilujących. Leki na bazie platyny zaliczane są do grupy związków o działaniu nieswoistym. W konsekwencji ich efektywność jest niezależna od fazy rozwoju komórki nowotworowej [14].

Cisplatyna (DDP) – *cis*-diaminadichloroplatyna(II) – jako pierwsza z grupy analogów związków platyny, stosowana była i jest do tej pory w terapii przeciwnowotworowej [17]. Chemioterapeutyk jest światłoczuły i ulega dekompozycji w środowisku wodnym ze względu na zmiany położenia atomów chloru [22]. DDP najczęściej do organizmu pacjenta podawana jest drogą dożylną w postaci wodnego roztworu soli. Wprowadzana forma cisplatyny jest nieaktywna, dopiero w organizmie następuje jej uaktywnienie [24].

Właściwie, o mechanizmie działania DDP (Rys. 4 [21]) nie wiadomo jeszcze wszystkiego. Lek wykazuje swoje właściwości cytotoksyczne poprzez wiązanie się z DNA i następnie ingerowanie w naturalną transkrypcję i/lub replikację nici kwasu nukleinowego [17]. Aktywna forma DDP powstaje w organizmie pacjenta poprzez podstawienie jednego anionu chlorkowego cząsteczką wody. Proces ten jest możliwy poprzez warunki panujące w organizmie (niski poziom stężenia chlorków ok. 100 mM w komórce). Utworzone kationowe kompleksy wiążą się z DNA, a dokładniej z pozycją N7 zasady purynowej – guaniny bądź w mniejszym stopniu adeniny. Powstające wiązania poprzeczne znajdują się zarówno w obrębie jednej, jak i obu nici DNA. Takie połączenia gwarantują aktywność przeciwnowotworową leku [21]. Powodują wywijanie, zawijanie i zaginanie nici. Ograniczają wewnątrzkomórkowe procesy, jak replikację, transkrypcję oraz naprawę DNA, co w konsekwencji wywołuje zahamowanie podziałów i śmierć komórki nowotworowej [21, 25]. Właściwości cytotoksyczne wzmagane są poprzez wiązanie cisplatyny (przed wniknięciem do komórki) m.in. z fosfolipidami występującymi w błonie komórkowej [17].



Rysunek 4. Mechanizm działania DDP (rysunek wykonany na podstawie [21])
 Figure 4. Mechanism of DDP action (the figure based on [21])

W szerokim zakresie DDP stosowana jest w leczeniu raka płuc, jajników, jąder, pęcherza moczowego oraz nerek [17]. Jednakże DDP nie jest lekiem selektywnym, przez co uszkadza także zdrowe tkanki. Toksycznie wpływa na komórki nerek, układu nerwowego i narząd słuchu. Dodatkowo powoduje problemy żołądkowe oraz niewydolność krążenia [22, 24].

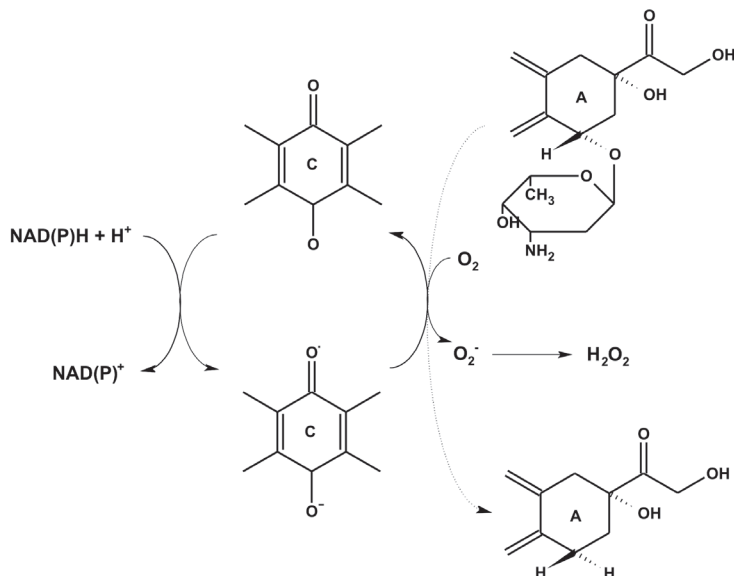
Karboplatyna (*cis*-diamina-[1,1-cyklobutandikarboksylato] platyna(II)) jest jednym z analogów cisplatyny. W swojej strukturze chemicznej zawiera ligandy tworzące pierścień chelatowy, który nadaje dużą stabilność związku. Charakteryzuje się słabym powinowactwem do białek. Karboksylanowy ligand w strukturze leku zwiększa jego rozpuszczalność w wodzie, co umożliwia łatwe przenikanie leku przez barierę krew–mózg. Chemioterapeutyk w większości usuwany jest z organizmu razem z moczem w niezmienionej postaci. Karboplatyna wykazuje mniejszą skuteczność działania niż cisplatyna w stosunku do guzów mózgu, raków głowy i szyi, przełyku oraz białaczek i chłoniaków. Z kolei efektywność leków jest zbliżona w leczeniu raka płuc czy jajników [17]. Mechanizm działania leku na DNA jest praktycznie taki sam, jak w przypadku cisplatyny. Reakcja z zastosowaniem karboplatyny jest wolniejsza (ok. 10-krotnie) i wymaga zdecydowanie większego stężenia (20–40 razy większe) [21]. Okazuje się, że karboplatyna jest lepiej tolerowana przez nerki oraz układ nerwowy niż cisplatyna. Powoduje występowanie nudności i wymiotów o mniejszym nasileniu, w konsekwencji polepsza komfort życia pacjentów. Najprawdopodobniej, mniejsza toksyczność związana jest z bardziej stabilnymi grupami opuszczającymi niż jony chlorkowe występujące w strukturze DDP [17, 21].

Oprócz karboplatyny, znanych jest więcej analogów cisplatyny o działaniu cytotoksycznym. Jednakże, cisplatyna i karboplatyna, są najczęściej wykorzystywane we współczesnej onkologii z całej gamy związków platynowych wykazujących aktywność przeciwnowotworową [17].

1.3. DOKSORUBICYNA

Doksorubicyna ((7*S*,9*S*)-7-[(2*R*,4*S*,5*S*,6*S*)-4-amino-5-hydroksy-6-metylooksan-2-yl]oksy-6,9,11-trihydroksy-9-(2-hydroksyacetyl)-4-metoksy-8,10-dihydro-7*H*-terraceno-5,12 dion)) (DOX) zaliczana jest do grupy antybiotyków antracyklicznych. W strukturze chemicznej DOX można wyróżnić dwa główne ugrupowania: aglikonowe oraz cukrowe (tzw. daunozamina). Ugrupowanie aglikonowe składa się z czterech pierścieni oznaczonych odpowiednio: A, B, C i D (Rys. 2). Cukier (3-amino-2,3,6-trideoksy-L-fukozył) połączony jest z pierścieniem A wiązaniem glikozydowym [15]. Czteropierścieniowa struktura jest charakterystyczna dla rodziny związków antracyklin i powoduje ich zabarwienie w środowisku wodnym, np. DOX barwi się na czerwono. W warunkach fizjologicznych część cząsteczek leku ulega dysocjacji, zaś około połowa pozostaje neutralna. Jednakże tylko niezysocjowane cząsteczki chemioterapeutyku wnikają do komórek w ramach dyfuzji pasywnej. Badania *in vitro* udowodniły znaczny wpływ wewnątrz- oraz zewnątrz-

komórkowego pH na wychwyt i dystrybucję antybiotyków antracyklicznych [26]. Doksorubicyna należy do grupy leków najskuteczniej i najefektywniej działających w fazie S cyklu komórkowego [14, 27]. Dodatkowo jej największa aktywność ma miejsce podczas monoterapii, czyli zaraz po zdiagnozowaniu nowotworu [27].



Rysunek 5. Jednoelektronowy cykl redoks antracyklin (rysunek wykonany na podstawie [15])
Figure 5. One-electron redox cycling of anthracyclines (the figure based on [15])

Antracykliny, w tym DOX, są wysoce aktywnymi cząsteczkami, które wykazują duże powinowactwo do DNA. Mechanizm działania omawianej grupy leków polega na interkalacji cząsteczki leku pomiędzy sąsiadujące zasady podwójnej helisy DNA [9, 26, 27]. Związanie chemioterapeutyku powoduje odsunięcie od siebie zasad oraz lokalne skrócenie helisy DNA w kierunku odwrotnym do pierwotnego [26]. W konsekwencji następuje upośledzenie naprawy DNA, ograniczenie syntezy DNA i RNA oraz zahamowanie aktywności wielu enzymów komórkowych. Zahamowanie aktywności topolimerazy II inicjuje śmierć komórki [15, 26, 27]. Antracykliny powodują przerwanie nici DNA w wyniku powstawania wolnych rodników, generowanych podczas jednoelektronowego podstawienia do grupy chininowej („pierścień C”) (Rys. 5 [15]). Proces wspomagany jest przez oksydoreduktazy. Semirodniki redukują tlen do reaktywnej formy $O_2^{\bullet -}$, która następnie tworzy H_2O_2 . Podczas cyklu następuje rozerwanie wiązania pomiędzy „pierścieniem A” a daunozaminą. Semirodniki wywołują zahamowanie aktywności enzymów oddechowych w mitochondriach i utlenianie błony lipidowej [15, 27]. W cyklu redoks DOX ma miejsce uwolnienie żelaza z zapasów wewnątrzkomórkowych. Wówczas tworzy się układ lek-żelazo, który zamienia $O_2^{\bullet -}$ oraz H_2O_2 w silniej działającą formę $\bullet OH$ [15]. Tak generowane uszkodzenie błon komórkowych odgrywa zasadniczą rolę w mecha-

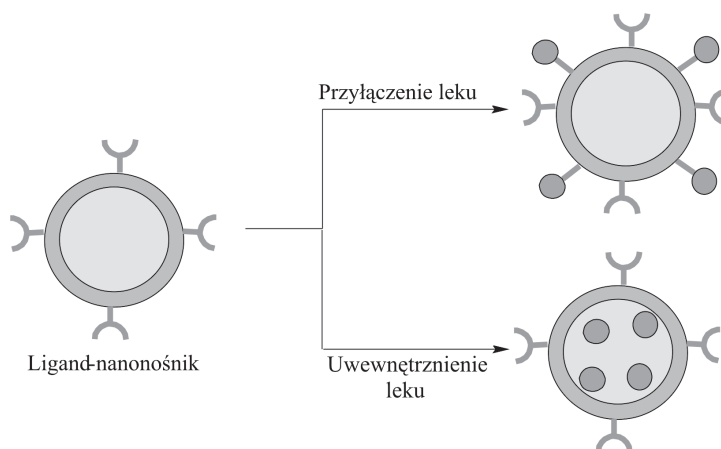
nizmie aktywności chemioterapeutyków z rodziny antracyklin w stosunku do komórek nowotworowych [15], jest jednak także przyczyną toksyczności leków z tej grupy [14].

Doksorubicyna stosowana jest najczęściej w leczeniu raka piersi, płuc, jajników, pęcherza moczowego, kości, różnych nowotworów wieku dziecięcego, mięsaków tkanek miękkich, chłoniaków oraz białaczek [15, 26]. Głównymi skutkami ubocznymi DOX są kardiotoxyczność i depresja szpiku [2].

2. POŁĄCZENIA NANONOŚNIK–LEK

Leki w celowanej terapii przeciwnowotworowej mogą być gromadzone zarówno na zewnątrz jak i we wnętrzu otwartych nanonośników (Rys. 6 [6]), w sposób niespecyficzny (np. adsorpcja) lub kowalencyjny [6].

Lek może zostać „włączony” do nanonośnika podczas syntezy nośnika bądź po jego uformowaniu. Gromadzenie chemioterapeutyku uzależnione jest od rozpuszczalności leku w substancji pomocniczej matrycy, masy cząsteczkowej, oddziaływań lek–nanonośnik, rodzaju występowania grup funkcyjnych na powierzchni nanonośników [10]. Materiał, z którego zbudowany jest nanonośnik powinien charakteryzować się biernością chemiczną oraz dużą czystością, co zapewni optymalne warunki kontrolowanego dostarczania leku [3].



Rysunek 6. Przyłączenie leku do powierzchni nośnika oraz umieszczenie go wewnątrz (rysunek wykonany na podstawie [6])

Figure 6. The drug conjugation to surface of a carrier and an entrapment process (the figure based on [6])

Bardzo często nanonośniki poddawane są wstępnej modyfikacji przed wprowadzeniem na ich powierzchnię chemioterapeutyków. Najpopularniejsza funkcjonalizacja obejmuje zastosowanie polimerów. Kilka naturalnych i syntetycznych polimerów strukturalnie liniowych bądź zwiniętych stosowanych jest w praktyce

medycznej, m.in.: glikol polietylenowy (PEG), kopolimer *N*-(2-hydroksypropylo)-metakryloamid (HPMA), kopolimer polistyrenu z bezwodnikiem maleinowym, poli-L-kwas glutaminowy (PG) oraz kwas poli(D,L-mlekowy-ko-glikolowy) (PLGA) [3]. Biokoniugacja leku z polimerem ma na celu poza ogólnym polepszeniem działania, wydłużenie cyrkulacji chemioterapeutyku w obiegu krwionośnym oraz jego trwałe i kontrolowane uwalnianie w ściśle określonym miejscu [7, 9, 28, 29]. Dodatkowymi atutami tego połączenia jest biodegradowalna natura polimerów, która w przypadku PLGA umożliwia degradację nanonośników do form kwasu mlekowego oraz glikolowego, które nie wykazują właściwości toksycznych dla organizmu [28]. Najpopularniejszy spośród wymienionych polimerów to PEG, który charakteryzuje się dużą rozpuszczalnością w wodzie. Zastosowanie PEG w medycynie jest bezpieczne, ze względu na jego cechy, mianowicie: biodegradowalność, minimalną toksyczność oraz kontrolowane właściwości mechaniczne [5, 7]. Polimery z jednej strony polepszają akumulację leku w określonym miejscu, jednak stwarzają barierę sferyczną pomiędzy nanonośnikiem a komórką nowotworową, co utrudnia wychwyt wewnątrzkomórkowy [9].

2.1. LEK WEWNĄTRZ NANONOŚNIKA

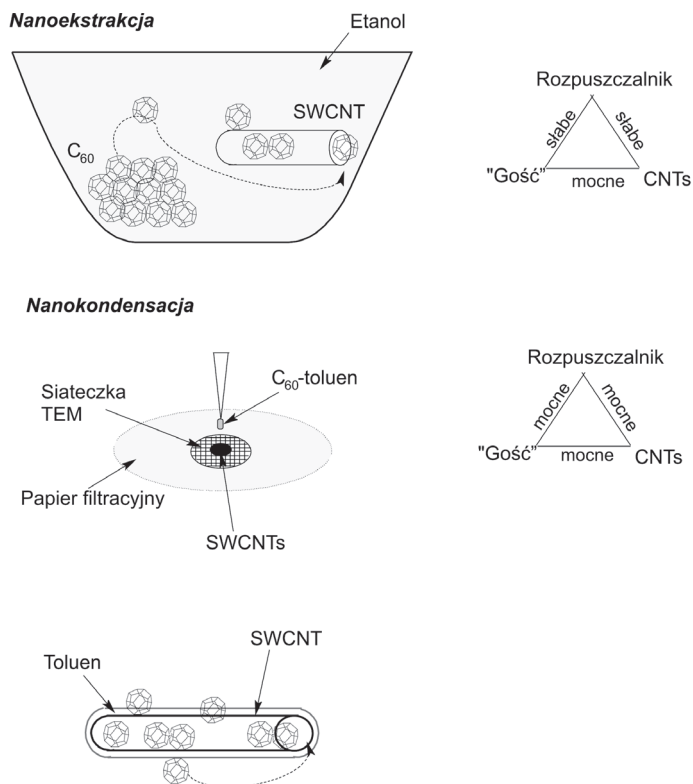
Wewnętrzne ściany nanonośników (np. CNTs) w przeciwieństwie do zewnętrznych charakteryzują się większą energią oddziaływania w stosunku do adsorbowanych molekuł (wpływ krzywizny). W związku z tym cząsteczka leku przenoszona w środku nanonośnika izolowana jest od wpływu otaczającego środowiska i jednocześnie chroniona przed przedwczesną aktywacją i procesem degradacji. Unieemożliwione jest wówczas oddziaływanie chemioterapeutyku ze zdrowymi tkankami [30, 31].

Chemioterapeutyk może zostać wprowadzony do wnętrza nanonośnika za pomocą nanoekstracji i nanokondensacji (Rys. 7 [32]). Wówczas nośnik staje się tzw. „nanokontenerem” [19, 31].

Nanoekstracja standardowo prowadzona jest z fazy ciekłej i w temperaturze pokojowej. Idea opiera się na odpowiednim doborze rozpuszczalnika względem wprowadzanej cząsteczki. „Gość” powinien wykazywać słabe powinowactwo do rozpuszczalnika oraz zdecydowanie większe do nanonośnika. Słaba rozpuszczalność wprowadzanych molekuł w rozpuszczalniku umożliwia ich „zawieszenie” w fazie ciekłej i stopniową dyfuzję do wnętrza nośnika [32].

Nanokondensacja, podobnie jak proces nanoekstracji, prowadzona jest w fazie ciekłej w temperaturze pokojowej. Jest stosunkowo prosta i szybka. W tym przypadku wprowadzane cząsteczki muszą charakteryzować się jednocześnie wysokim powinowactwem do rozpuszczalnika oraz nanonośnika. Ogólna zasada nanokondensacji polega na adsorpcji cząsteczek rozpuszczalnika na wewnętrznych i zewnętrznych ścianach nośnika. Cząsteczki „gości” przenikają przez utworzoną,

cienką warstwę i wiążą się ze ścianą nośnika w najkorzystniejszym energetycznie miejscu poprzez oddziaływania van der Waalsa [32].



Rysunek 7. Nanoekstrakcja, nanokondensacja (rysunek wykonany na podstawie [32])

Figure 7. Nanoextraction, nanocondensation (the figure based on [32])

W zależności od średnicy nanonośników, wprowadzane cząsteczki mogą układać się m.in. w pojedyncze bądź podwójne łańcuchy lub tworzyć fazę o ułożeniu zygzakowatym [32].

Metoda nanoekstrakcji została niedawno szczegółowo opisana [19]. Proces polegał na umieszczeniu leku przeciwnowotworowego – heksametylmelaminy (HMM) wewnątrz CNTs. Umieszczono także C₆₀ jako zamknięcie otwartych zakończeń CNTs. Proces nanoekstrakcji poprzedzony był potraktowaniem CNTs mieszaniną kwasów (HNO₃, H₂SO₄). Pozwoliło to na otwarcie CNTs oraz wytworzenie ugrupowań karboksylowych, które stanowiły barierę „wejścia” dla innych cząsteczek. Autorzy udowodnili, iż tak przygotowane CNTs są odpowiednimi kandydatami do bycia nośnikami leków. Stabilna struktura CNTs oraz C₆₀ chroniły lek. Dodatkowo dobór odpowiednich komponentów uszczelniających nanorurkę pozwolił na kontrolowane uwalnianie leku z jej wnętrza [19].

Tripisciano i współpracownicy [33] w swojej pracy zaprezentowali układ jednościennych nanorurek węglowych (SWCNTs) wypełnionych cisplatyną stosowany w badaniach raka prostaty. Wstępna faza przygotowywania układu obejmowała otwarcie struktury SWCNTs poprzez zastosowanie mieszaniny $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{SO}_4$ (1:2). Lek wprowadzono do wnętrza przygotowanych SWCNTs metodą nanokondensacji kapilarnej. Materiał węglowy rozproszono w roztworze dimetyloformamidu (DMF) z DDP. DMF z układu po reakcji został usunięty za pomocą mieszaniny acetonu z metanolem, zaś pozostałości DDP na zewnętrznej powierzchni SWCNTs odmyto wodą. Nanorurki węglowe ograniczyły wytrącanie się leku w środowisku wodnym oraz zminimalizowały jego degradację. Obecność cisplatyny w nanorurkach węglowych potwierdziły badania, m.in. FTIR, spektroskopii Ramana, HR-TEM oraz EDX. Autorzy przeprowadzili analizy oceniające wpływ różnych stężeń „wolnego” leku oraz cisplatyny wewnątrz nanoosiłnika na żywotność komórek nowotworowych. Zaobserwowano wprost proporcjonalną zależność niszczenia chorych tkanek wraz ze wzrostem zawartości nośnika SWCNTs-DDP. Dodatkowo, wyższe stężenie SWCNTs-DDP wywierało tak samo silny wpływ na komórki nowotworowe jak „wolny” lek, przy czym nowatorski układ powodował mniej skutków ubocznych. W innej pracy Tripisciano i współpracownicy [34] wykorzystali także metodę nanokondensacji kapilarnej, tym razem do napełnienia wielościennych nanorurek węglowych (MWCNTs) również cisplatyną. Metodyka uwewnętrznienia chemioterapeutyku w strukturze MWCNTs była taka sama jak dla SWCNTs. Jedyna różnica polegała na zmianie czynnika oczyszczającego i otwierającego nanorurki. Mianowicie w przypadku wielościennych nanorurek węglowych zastosowano 12 M HCl. Wykorzystanie takiej samej metodyki wypełnienia materiałów węglowych charakteryzujących się odmienną ilością ścian skutkuje inną efektywnością przenoszenia cząsteczek leku, zgodnie z wynikami zamieszczonymi w Tabeli 1.

Tabela 1. Efektywność dostarczania DDP przez SWCNTs [33] oraz MWCNTs [34]

Table 1. Effectiveness of DDP delivery by SWCNTs [33] and MWCNTs [34]

	SWCNTs	MWCNTs
Ilość leku wewnątrz CNTs	21 $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ CNTs	13,6 $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ CNTs
Ilość uwolnionego leku	68%	95%
Szybkość uwalniania leku	Wolniej	Szybciej
Czas, po którym nastąpiło uwolnienie maksymalnej dawki	72 h	48 h

Praktycznie cała ilość zgromadzonego leku w MWCNTs jest uwalniania, co według autorów może świadczyć o ochronie struktury chemioterapeutyku. Prawdopodobnie w systemie DDP-MWCNTs nie występują wzajemne oddziaływania, które mogą mieć miejsce dla układu DDP-SWCNTs i powodować dezaktywację leku. Wspomniane oddziaływania wynikają z obecności wewnątrz CNTs grup funkcyjnych, które powstały w wyniku traktowania SWCNTs czynnikiem utleniającym ($\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{SO}_4$) i nie zostały dostatecznie usunięte. W konsekwencji mimo większej

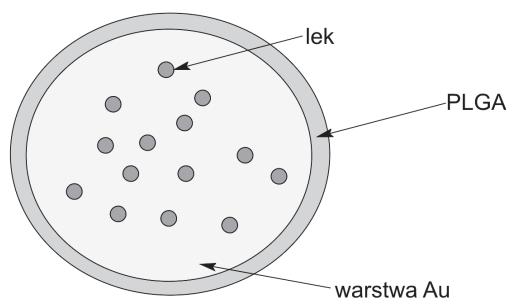
zawartości DDP zgromadzonej wewnątrz SWCNTs niż w MWCNTs, została uwolniona mniejsza ilość leku.

DDP wprowadzona została do wnętrza nanocząstki otoczonej kopolimerem przez grupę badawczą Gryparis [35]. Układ zastosowano przeciwko nowotworowi prostaty. Lek zachowywał swoją aktywność po wprowadzeniu do nośnika. Selekttywne dostarczanie DDP przez nanocząstki do komórek nowotworowych pozwoliło na uzyskanie lepszego efektu terapeutycznego w porównaniu do stosowania wodnego roztworu DDP w tradycyjnej terapii. Uzyskany system okazał się bezpieczny. Cisplatyna z powodzeniem wprowadzana jest także do innych nanonośników: miceli polimerowych [36, 37] czy liposomów [38, 39]. Badania *in vivo* oraz *in vitro* skierowano przeciwko różnym typom linii nowotworowych: chłoniaka (J6456) [38], jelita grubego (C26) [38, 39], płuc [39], żołądka (MKN 45) [37]. Prace jednoznacznie potwierdzają, że enkapsulacja DDP wewnątrz nanonośników polepsza aktywność leku i zmniejsza skutki uboczne, poprzez lokalne uwalnianie odpowiedniej dawki w chorych komórkach [36–39].

Grupa badawcza Hampela umieściła karboplatynę we wnętrzu nanorurek węglowych [40]. Po otwarciu nanonośnika lek został wprowadzony tzw. metodą „mokrą”. Wyniki uzyskane z EELS oraz XPS wskazywały na całkowite zachowanie struktury karboplatyny. Cytotoksyczność nośnika wypełnionego lekiem analizowano testem żywotności. Karboplatyna hamowała wzrost komórek nowotworowych krwi. Praca potwierdza skuteczność stosowania nanorurek węglowych, jako nanonośników chemioterapeutyków [40]. Wprowadzenie dokсорubicyny do wnętrza nanocząstek o średnicy 100 nm przedstawiła grupa Mitra [41]. Dodatkowo, lek sprzężono z dekstranem, w celu zmniejszenia skutków ubocznych wywołanych przez DOX. Układ przenoszenia leku nanocząstka–DOX uzyskano metodą odwróconej mikroemulsji. Powierzchnia systemu pokryta była polisacharydem – chitozanem, zwiększającym hydrofilowość nośnika. Autorzy [41] udowodnili nie tylko minimalizację toksycznych skutków, ale także polepszenie efektu terapeutycznego chemioterapeutyku w nanocząstce w stosunku do „wolnej” dokсорubicyny. Zaobserwowano *in vivo* zmniejszenie się objętości guza po 4 tygodniach stosowania układu nanocząstka–DOX, co nie było widoczne podczas terapii z wykorzystaniem tylko leku. Dodatkowo, czas obiegu dokсорubicyny w krwi oraz ilość jej akumulacji w komórce nowotworowej uległy polepszeniu.

Lince [42] oraz Park [43] także opisali proces umieszczenia dokсорubicyny wewnątrz nanocząsteczek. Lince [42] opisał nanocząstki syntezowane na bazie biodegradowalnego i biokompatybilnego kopolimeru. Zastosowanie nanonośnika polimerowego wywołało polepszenie aktywności leku umieszczonego wewnątrz oraz minimalizację jego możliwych skutków ubocznych. W związku z tym zwiększył się komfort życia pacjentów poddanych tej terapii. Park [43] podobnie jak Lince [42] przedstawił umieszczenie dokсорubicyny wewnątrz nanocząstki polimerowej z dodatkową warstwą złota (Rys. 8 [43]). Uzyskano interesujący układ, mianowicie DOX wewnątrz nanocząstki otoczonej PLGA i warstwą Au, łączący w sobie tra-

dycyjną chemioterapię i fototerapię. Jego skuteczność zbadano względem komórek nowotworowych szyjki macicy. Nowatorska terapia charakteryzowała się wysoką efektywnością terapeutyczną oraz stosunkowo krótkim czasem leczenia. System DOX-PLGA-Au selektywnie dostarczał nie tylko lek do komórki nowotworowej, ale także powodował wzrost temperatury, który wzmagił niszczenie chorych tkanek. Ciepło generowane było w wyniku absorpcji promieniowania NIR przez nanocząstki złota.



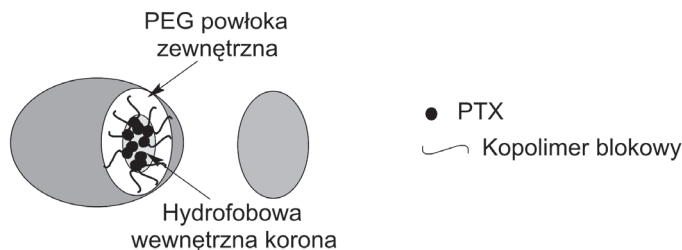
Rysunek 8. Schematyczny diagram DOX-PLGA-Au (rysunek wykonany na podstawie [43])

Figure 8. Schematic diagram of DOX-PLGA-Au (the figure based on [43])

Dokosorubicyna w terapii przeciwnowotworowej z powodzeniem była również stosowana wewnątrz liposomów przez m.in. Matsumura [44] oraz Gabizon [45] oraz miceli przez Kataoka [46].

Paklitaksel także może zostać z powodzeniem wprowadzony do wnętrza nanonośników. Koziara i inni [47] zastosowali paklitaksel wewnątrz nanocząstki w badaniach *in vitro* z użyciem dwóch linii pochodzących z guzów mózgu U-118 oraz HCT-15. Udowodniono zwiększenie aktywności cytotoksycznej chemioterapeutyku oraz ograniczenie działania transbłonowej pompy lekowej, co pozwoliło na polepszenie wychwytu leku przez komórki nowotworowe. Uzyskany system przenoszenia PXL doskonale przenikał przez barierę krew-mózg, która następcza wiele trudności w tradycyjnej terapii. Analiza układu PXL-nanocząstka potwierdziła stabilizację struktury leku. Z kolei autorzy Ruan i Feng [48] dodatkowo udowodnili, że uwalnianie paklitakselu z nanocząstki ułatwione jest poprzez pokrycie powierzchni nanonośnika kopolimerem PLA-PEG-PLA. Hydrofilowe ugrupowania PEG wewnątrz hydrofobowych segmentów PLA prawdopodobnie odpowiedzialne są za polepszenie uwolnienia chemioterapeutyku z nanocząstki [48]. Skuteczność i efektywność umieszczenia paklitakselu wewnątrz nanocząstki polimerowej potwierdził także Fonseca wraz ze współpracownikami [49].

Paklitaksel z powodzeniem przenoszony jest także wewnątrz miceli polimerowych. Grupa badawcza Hamaguchi [50] zaprezentowała nową formę PXL, mianowicie – NK105, czyli lek przenoszony w miceli (Rys. 9 [50]).



Rysunek 9. Schematyczna struktura NK105 (rysunek wykonany na podstawie [50])
 Figure 9. Schematic structure of NK105 (the figure based on [50])

Wprowadzenie NK105 do organizmu odbywało się bez dodatku Cremophor EL oraz etanolu, co jest nieuniknione w tradycyjnym leczeniu. Nowa forma chemioterapeutyku wykazywała podobne kliniczne korzyści do wcześniej stosowanych. Jednakże jej zdecydowaną zaletą okazała się mniejsza toksyczność wywołwana w obwodowym układzie nerwowym oraz zdecydowanie mocniejsza aktywność polepszająca efekt EPR [50]. Podobne umieszczenie paklitakselu wewnątrz miceli polimerowej w postaci Genexol-PM zaprezentowała grupa badawcza Kima [51], która potwierdziła skuteczność nowej formy.

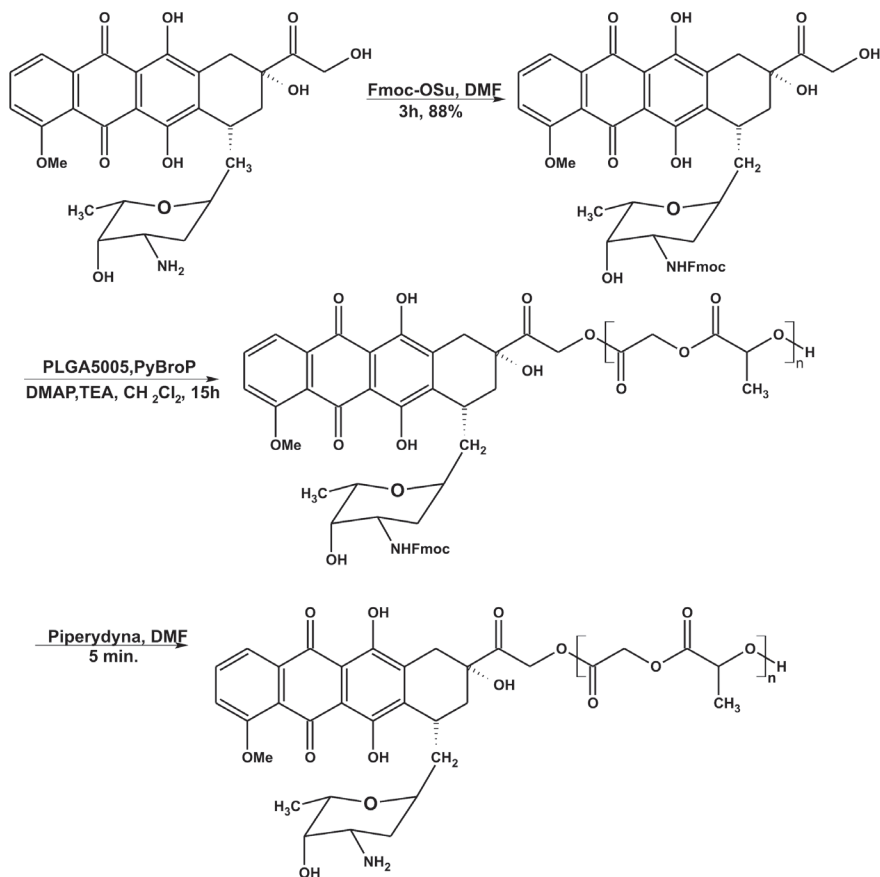
2.2. LEK NA ZEWNĄTRZ NANONOŚNIKA

Powszechnym sposobem dostarczania chemioterapeutyków jest chemiczne bądź fizyczne przyłączenie/gromadzenie leku na zewnętrznej powierzchni nano-nośnika wykorzystujące jego właściwości chemiczne oraz dużą powierzchnię [31]. Cząsteczka leku może być sprzężana z grupami funkcyjnymi nano-nośnika lub polimerem otaczającym nano-nośnik za pomocą wiązań kowalencyjnych tworzących grupy: estrowe, amidowe, *N*-acetylohydrazonu. Połączenia te powinny odznaczać się niską trwałością, pozwalającą na uwolnienie chemioterapeutyku [52]. Dodatkowo wiązanie nośnik–lek powinno charakteryzować się wrażliwością na pH, którego wartość musi być nieznacznie większa (o 0,5–1 jednostkę) niż pH panujące w przeciętnych tkankach i krwi [12]. Leki o strukturze płaskiej i aromatycznej mogą być także adsorbowane na odpowiednio przygotowanej powierzchni nano-nośnika, najczęściej w wyniku oddziaływań π - π [52].

2.2.1. Grupa estrowa

Wiązanie estrowe tworzone pomiędzy doksorubicyną a nano-nośnikiem zazwyczaj osiągnąć jest w wyniku biokoniuugacji pierwszorzędowej grupy hydroksylowej ($-C=OCH_2OH$) chemioterapeutyku z grupą karboksylową znajdującą się na zakończeniach polimeru, np. PLGA otaczającego nano-nośnik (Rys. 10 [28]) bądź pomię-

dzy grupą aminową DOX a hydroksylową PLGA (Rys. 11 [29]). W pierwszym przypadku proces zachodzi w obecności PyBroP/DMAP. Podczas reakcji pierwszorzędowa amina ugrupowania cukrowego w DOX chroniona jest przez Fmoc-Osu, a następnie odbezpieczana [28]. Z kolei druga możliwość polega na reakcji pierwszorzędowej aminy w cząsteczce leku z terminalną grupą hydroksylową w PLGA uprzednio poddaną aktywacji chloromrówczanem *p*-nitrofenyłu [29].

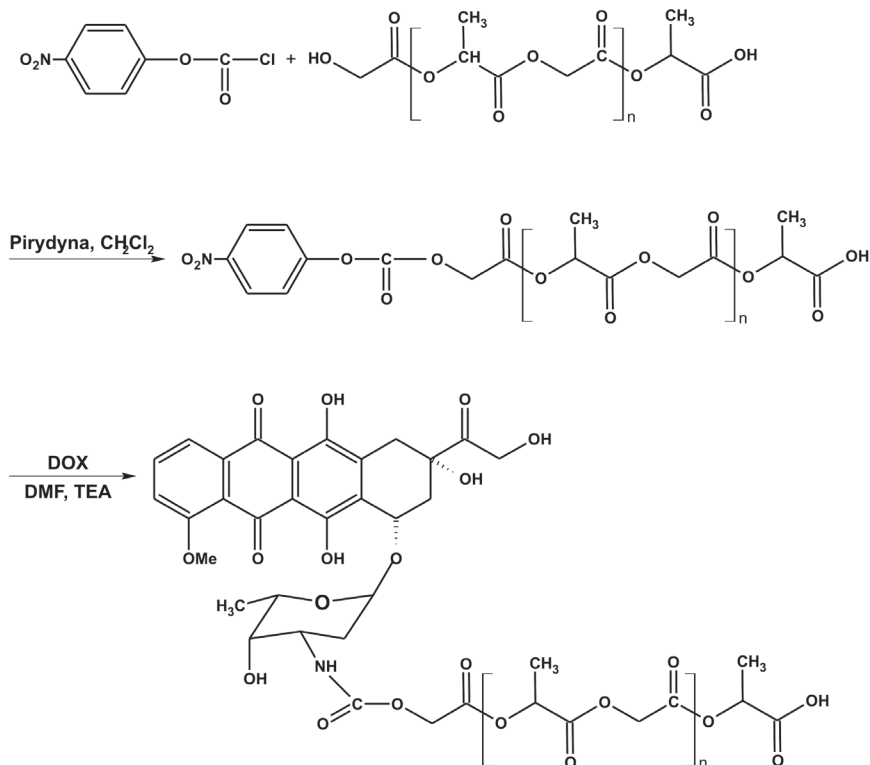


Rysunek 10. Schemat reakcji tworzenia wiązania estrowego DOX-PLGA (rysunek wykonany na podstawie [28])

Figure 10. The scheme of the formation of ester bound DOX-PLGA (the figure based on [28])

Yoo i współpracownicy w swoich pracach [28, 29] opisywali tworzenie wiązania estrowego pomiędzy doksorubicyną a PLGA na nanoosińniku. Oddziaływanie było generowane odpowiednio między grupami hydroksylową-karboksylową [28] oraz aminową-hydroksylową [29]. Nowoczesne systemy dostarczania leku przebadano zarówno *in vivo* jak i *in vitro* na linii komórek nowotworowych HepG2. Wykazano, iż w obydwu przypadkach, lek połączony chemicznie z PLGA był lepiej wychwytywany przez chore tkanki, w porównaniu do chemioterapeutyku, który

był umieszczony wewnątrz nanocząstki dekorowanej PLGA. Dodatkowo, przyłączenie dokсорubicyny wiązaniem estrowym z polimerem charakteryzowało się większą pojemnością względem leku. Chemicznie związana DOX uwalniana była w sposób ciągły przez ponad miesiąc, podczas gdy niezwiązany chemioterapeutyk – w przeciągu ok. 5 dni (czyli znacznie szybciej) [28, 29]. Autorzy wykazali proporcjonalną zależność szybkości uwalniania leku z nanonośnika od masy cząsteczkowej polimeru pokrywającego jego powierzchnię. W badaniach *in vivo*, dokсорubicyna przenoszona za pomocą jedynie nośnika, podana jednorazowo wykazała zbliżoną aktywność do „wolnego” leku podawanego przez cały dzień [28].



Rysunek 11. Schemat reakcji tworzenia wiązania estrowego DOX-PLGA (rysunek wykonany na podstawie [29])

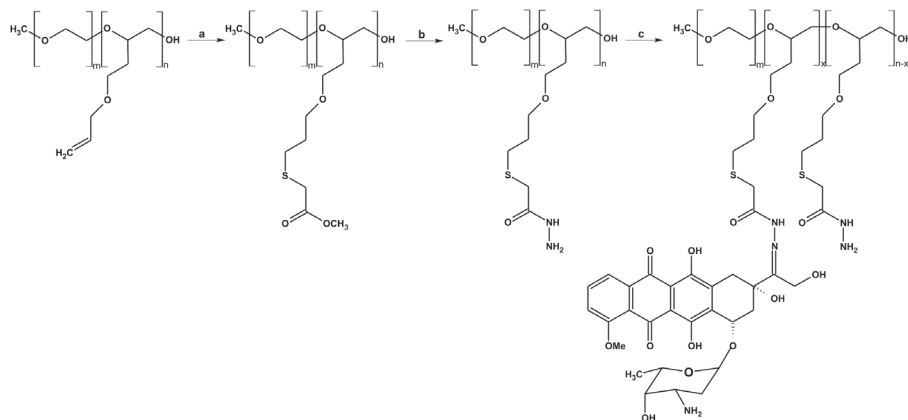
Figure 11. The scheme of the formation of ester bound DOX-PLGA (the figure based on [29])

Inne leki przeciwnowotworowe, np. paklitaksel, również mogą oddziaływać z nanonośnikiem poprzez wiązanie estrowe. Li i współpracownicy [53] przyłączyli paklitaksel wiązaniem estrowym do powierzchni polimerowego nośnika otoczonego poli-L-kwasem glutaminowym (PG). Zaobserwowano *in vivo* wzrost aktywności terapeutycznej leku w stosunku do raka jajnika typu OCa-1, w porównaniu do tradycyjnej terapii bazującej na podawaniu „zwykłego” PTX. Dodatkowo, stężenie

uwalnianego chemioterapeutyku z nanocząstki pozostawało względnie stałe w chorych tkankach: 489, 949 oraz 552 ng/g podczas dozowania odpowiednio w czasie 5, 48 i 144 h. Autorzy udowodnili, że połączenie PG-PTX wykazuje mniejszą toksyczność niż PTX. Wzrost aktywności nowatorskiego układu związany jest z jego lepszym wychwytem przez komórki nowotworowe oraz dłuższym czasem biodystrybucji poprzez poprawienie efektu EPR. Rezultat ten sugeruje, że zastosowanie labilnego wiązania estrowego pomiędzy nośnikiem polimerowym a chemioterapeutykiem jest użyteczną metodą do projektowania nowatorskich systemów dostarczania leków. Taki sam sposób łączenia paklitakselu z nośnikiem polimerowym zastosowała również grupa badawcza Milasa [54], która potwierdziła skuteczność metody.

2.2.2. Grupa *N*-acetylohydrazonu

Grupa *N*-acetylohydrazonu tworzona jest w wyniku sprzężenia grupy aldehydowej z hydrazydową. Takie połączenie pomiędzy nano-nośnikiem a lekiem wykazuje zwiększony poziom cytotoxyczności w stosunku do niektórych linii komórek nowotworowych [55]. Dokсорubicyna zawiera w swojej strukturze ugrupowanie aldehydowe pozwalające na łączenie leku z terminalnymi grupami hydrazydowymi znajdującymi się na powierzchni odpowiednio przygotowanych nano-nośników. Najczęściej grupy hydrazydowe pochodzą od polimerów otaczających nośniki [56], np. poli(allil glicydyłu eter) [57] (Rys. 12 [57]), poli(tlenek etylenu)-polilaktyd [58], poli(tlenek etylenu)-poli(allil glicydyłu eter) (PEO-PAGE) [56], HPMA [55].



Rysunek 12. Schemat reakcji tworzenia grupy *N*-acetylohydrazonu DOX-polimer (rysunek wykonany na podstawie [57])

Figure 12. The scheme of the formation of acethyl-hydrazone group DOX-polimer (the figure based on [57])

Reakcja sprzęgania leku z nanoosiłnikiem powinna być przeprowadzana w obecności buforu (np. octanowego [57], fosforanowego [56]) lub w warunkach bezwodnych, (np. mieszanina dimetylsulfoksydu z metanolem [57], DMSO/AcOH z dodatkiem bezwodnego siarczanu sodu [56]). Proces jest katalizowany kwasami, co pozwala na uzyskanie większej wydajności połączenia [57]. Uzyskane wiązanie jest nieaktywne w średnio kwaśnym środowisku. Cecha ta stanowi atut połączenia, gdyż wzmacnia selektywność uwalniania chemioterapeutyku w guzie, gdzie panuje niższe pH niż w osoczu krwi. Niska wartość pH w komórkach nowotworowych wywołana jest ich niedotlenieniem [57].

Układ micelarny na bazie amfifilowego, diblokowego kopolimeru zawierającego hydrofilowy politlenek etylenu i blok hydrofobowy zawierający DOX zaproponowany przez Vetvicka i współpracowników [57] wykazywał 20 razy mniejszą toksyczność niż „wolny” lek oraz wydłużony czas cyrkulacji w obiegu krwionośnym. W stosunku do komórek chłoniaka typu EL-4 T zaobserwowano obiecującą aktywność terapeutyczną. Mianowicie, 75% myszy uległa całkowitemu wyleczeniu. Dodatkowo, traktowanie myszy systemem micelarnym wywołało specyficzną odporność na powstawanie komórek nowotworowych [57].

Hrubý i inni [56] opisali tworzenie grupy *N*-acetylohydrazonu pomiędzy doksorubicyną a nośnikiem micelarnym dekorowanym PEO-PAGE. Autorzy wykazali, że lek uwalniany jest szybciej z nanoosiłnika przy pH odpowiadającym pH w endosomach (pH 5,0) niż przy pH osocza krwi (pH 7,4). Prawdopodobnie, efekt ten związany jest z przesunięciem równowagi pomiędzy wolnymi cząsteczkami DOX a związanymi z nośnikiem w kierunku uwalniania leku w pH 5,0 niż pH 7,4. Większa ilość wolnych molekuł DOX przy pH 5,0 wywołana jest wzrostem stopnia protonizacji ugrupowań aminowych i hydrazydowych kopolimeru. Yoo wraz z innymi [58] także zaprezentowali opisywany typ wiązania pomiędzy doksorubicyną a micelą polimerową uzyskaną na bazie poli(L-kwasu mlekowego) (PLA) oraz metoksy-glikolu polietylenowego (mPEG). Lek został przyłączony do terminalnych grup PLLA-PEG aktywowanych wstępnie hydrazyną tworzącą ugrupowanie hydrazydowe na nośniku reagującym następnie z grupami hydroksylowymi doksorubicyny. Autorzy wysunęli hipotezę stwierdzającą, że doksorubicyna połączona wiązaniem charakteryzującym się małą trwałością w kwaśnym środowisku, szybko dostarczana jest do wnętrza komórek nowotworowych poprzez mechanizm endocytozy i tam uwalniana działa silnie cytotoksycznie [58].

Leki na bazie platyny, podobnie jak doksorubicyna wykazują strukturalne właściwości umożliwiające połączenie nanoosiłnik-lek z wytworzeniem grupy *N*-acetylohydrazonu. Zespół badawczy Aryala [59] zaproponował biokonjugację kopolimeru PEG-PLA zakończonego ugrupowaniami hydrazydowymi PEG-PLA-NH-NH₂ z kwasem lewulinowym modyfikowanym analogiem cisplatyny Pt(IV). W wyniku połączenia dwóch komponentów w stosunku 2:1 powstał układ polimer-cisplatyna tworzący następnie nanocząsteczkę o rozmiarze 100 nm. Zastosowanie metody przyłączenia kowalencyjnego leku do powierzchni nanocząstki umożliwiło kontrolowanie ilości gromadzonych molekuł chemioterapeutyku na

nanonośniku. Nanocząstki polimerowe przenoszące cisplatynę polepszyły jej właściwości cytotoksyczne względem komórek nowotworowych jajników w porównaniu do tradycyjnej chemioterapii. Autorzy udowodnili mniejszą stratę leku podczas krążenia nanocząstki w obiegu krwionośnym w warunkach naturalnego pH. Sposób zaproponowany przez autorów [59], mający na celu szybkie uwalnianie dużej dawki leku z nanonośników do komórek nowotworowych zdecydowanie polepsza efektywność terapeutyczną chemioterapeutyku i rokuje dobrze na przyszłość leczenia.

Opisywany typ wiązania możliwy jest także pomiędzy molekułami paklitakselu a nanonośnikami, np. dendrymerem. Dendrymery poliamidoaminowe (PAMAM) okazują się być odpowiednimi nanonośnikami dla leków przeciwnowotworowych. Rdzeń zbudowany jest z alkilowanych cząsteczek diamin połączonych z trzeciorzędowymi aminami. Oddalone grupy aminowe nanonośnika umożliwiają łatwą funkcjonalizację z lekami. Modyfikacja powierzchni dendrymeru za pomocą paklitakselu została zastosowana w leczeniu raka jajników. Dodatkowo nanonośnik sfunkcjonalizowano celowanym ligandem w postaci białka LXW7 pozwalającym na wychwytywanie konkretnych komórek nowotworowych. Metodyka okazała się efektywna i spowodowała eliminację nowotworu. Dendrymer modyfikowany lekiem został wstrzyknięty w okolice guza. W kwaśnym pH, wobec komórek nowotworowych, wiązanie lek–nanonośnik uległo rozerwaniu, nastąpiło uwolnienie leku i jego aktywacja [60]. Rodrigues wraz ze współpracownikami [61] zaproponowali biokoniugację paklitakselu z polimerowym nośnikiem – glikolem polietylenowym PEG. Reakcja wymagała wstępnej modyfikacji cząsteczek chemioterapeutyku. Uzyskano maleimidowe pochodne paklitakselu poprzez przyłączenie ugrupowania maleimidowego do cząsteczki leku. Proces polegał początkowo na syntezie pochodnej estrowej leku w pozycji C-2'-OH w wyniku zastosowania kwasu 4-acetylbenzoesowego. Powstały produkt pośredni zapewniał obecność odpowiedniej grupy karbonylowej niezbędnej do połączenia pochodnej kwasu maleiminowego zawierającej ugrupowanie hydrazydowe. Uzyskana maleimidowa pochodna paklitakselu reagowała szybko i selektywnie poprzez podwójne wiązanie z grupą tiolową PEG tworzącą tioeterowe wiązanie i finalny produkt. Autorzy dowiedli skuteczność metody w sferze zachowania struktury i jednoczesnego polepszenia aktywności leku w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*.

2.2.3. Grupa amidowa

Wiązanie amidowe powstaje w wyniku reakcji grupy karboksylowej z nukleofilem zawierającym pierwszorzędową aminę. Tworzenie wiązania amidowego pomiędzy SWCNTs a związkami platyny zaproponował Feazel wraz ze współpracownikami [62]. Autorzy sfunkcjonalizowali jednościenne nanorurki węglowe fosfolipidem z aminą wewnątrz struktury. Łańcuch glikolu polietylenowego (PEG) pomiędzy grupą aminową a zakotwiczonym fosfolipidem polepszył rozpuszczalność SWCNTs oraz oddalił grupy funkcyjne od powierz-

chni nanorurek. Do tak przygotowanego materiału przyłączono związek c,c,t -[Pt(NH₃)₂Cl₂(OEt)(O₂CCH₂CH₂CO₂H)], jako „prolek”. Mechanizm reakcji opierał się na zastosowaniu EDC oraz *N*-hydroksysukcynimidu (NHS). Utworzony produkt pośredni łączył się wiązaniem amidowym z PEG na powierzchni SWCNTs. Uzyskany układ wychwytywany był i uwewnętrzniany w endosomach organizmu, w których niskie pH pozwoliło na uwolnienie aktywnego związku – cisplatyny (DDP). Zastosowanie opisanej metodyki pozwoliło na uniknięcie m.in. słabej cyrkulacji i dystrybucji leku w krwi oraz zmniejszyło toksyczność DDP względem komórek zdrowych [62].

Dostarczanie przez SWCNTs paklitakselu, przyłączonego wiązaniem amidowym, opisał w swojej pracy Liu wraz ze współpracownikami [63]. Początkowo sfunkcjonalizowano nanorurki węglowe za pomocą glikolu polietylenowego z ugrupowaniem aminowym (PEG-NH₂). Z kolei do struktury cząsteczki leku wprowadzono grupę karboksylową w pozycji C-2'-OH. Przyłączenie PTX do sfunkcjonalizowanych nanorurek węglowych miało miejsce w obecności czynnika aktywującego EDC/NHS. Lek przyłączony do nanoosiłnika wykazywał w badaniach *in vivo* znacznie większą rozpuszczalność niż kliniczna forma PTX – Taxol. Toksyczność wspomnianych struktur PXL jest podobna. Układ SWCNTs-PXL w porównaniu do Taxolu charakteryzował się dłuższym czasem przebywania w obiegu krwionośnym, większym (ok. 10-krotnie) wychwytem przez komórki nowotworowe oraz silniejszym efektem terapeutycznym. Nowa formuła paklitakselu wykazywała zdolność powolnego zmniejszania objętości guza przy niewielkich dawkach chemioterapeutyku (5 mg/kg PTX). Wszystkie wspomniane właściwości przyczyniły się do zmniejszenia skutków ubocznych [63].

Inny lek, jakim jest doksorubicyna, także może zostać przyłączony do nanoosiłnika poprzez wiązanie amidowe. Liu wraz ze współpracownikami [64] zaproponowali biokoniugację DOX do powierzchni poliamidoaminowego dendrymeru. Skuteczność oraz efektywność uzyskanego układu dostarczania leku określono względem komórek nowotworowych działy linii Ca9-22. Cytotoksyczność przenieszonego chemioterapeutyku zwiększyła się w porównaniu do terapii z wykorzystaniem „wolnego” leku.

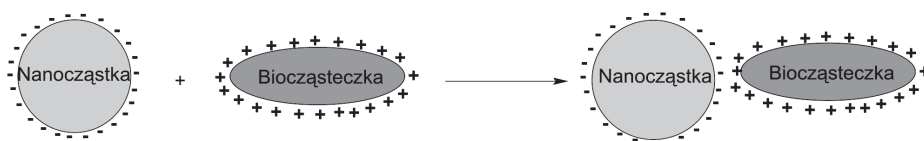
2.2.4. Grupa disiarczkowa

Wiązanie disiarczkowe pomiędzy lekiem a nanoosiłnikiem jest odpowiednie w celu selektywnego dostarczania i kumulowania wysokiego stężenia chemioterapeutyku. Większość leków i nanoosiłników nie posiada w swojej budowie grup tiolowych, jednakże odpowiednia ich modyfikacja pozwala na uzyskanie wiązania disiarczkowego. Struktury chemioterapeutyków zawierające ugrupowania aminowe bądź karboksylowe wiążą np. peptydy, które są nośnikami grup tiolowych. Układ taki umożliwia utworzenie wiązania disiarczkowego [12].

Paklitaksel połączony wiązaniem disiarczkowym do powierzchni jednościennej nanorurek węglowych zastosowano w leczeniu białaczki linii L1210FR. Łącznik disiarczkowy został przyłączony w pozycji C-2' leku. Z drugiej strony nośnik – nanorurki węglowe poddano modyfikacji poprzez: utlenienie, wprowadzenie ugrupowań amidowych oraz funkcjonalizację ugrupowaniami aminowymi. Ponadto autorzy zastosowali biotyne, jako celowany ligand. Traktowanie komórek białaczkowych nowoczesnym układem dostarczania paklitakselu skutecznie je niszczyło. Chemioterapeutyk uwalniany był w postaci aktywnej poprzez rozzerwanie wiązania disiarczkowego po uwewnętrznieniu nowatorskiego układu [65].

2.2.5. Adsorpcja

Chemioterapeutyki gromadzone są także na zewnętrznej powierzchni nano-nośników w wyniku adsorpcji fizycznej, dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym pomiędzy powierzchnią nośnika a białcząsteczką (Rys. 13 [66]).



Rysunek 13. Oddziaływanie elektrostatyczne nanocząstka-białcząsteczka (rysunek wykonany na podstawie [66])

Figure 13. Electrostatic interaction of nanomolecule-biomolecule (the figure based on [66])

Kataoka wraz ze współpracownikami [67] opisali adsorpcję fizyczną dokso-rubicyny na powierzchni nośnika micelnego syntezowanego z kopolimeru blokowego PEG–PBLA. Układ lek–nano-nośnik uzyskano w wyniku oddziaływań π - π pomiędzy ugrupowaniem antracyklinowym DOX a segmentami benzyłowymi PBLA. Lek przenoszony za pomocą polimerowej miceli wykazywał większą aktywność w porównaniu do wolnego leku. Micele formowane na bazie PEG–PBLA wydłużały czas cyrkulacji DOX w krwiobiegu, prawdopodobnie dzięki sterycznemu mechanizmowi stabilizującemu i maskującemu. Greisha wraz ze współpracownikami [68] wykazali 13-krotny wzrost stężenia leku wewnątrz guza S-180, podczas przenoszenia dokso-rubicyny adsorbowanej na powierzchni miceli polimerowej w porównaniu do wolnego cytostatyku. Nowy system przenoszenia leku charakteryzował się polepszeniem właściwości terapeutycznych, przy jednoczesnym obniżeniu skutków ubocznych [67].

Z kolei grupa Ali-Boucetta [69] zaproponowała niekowalencyjne połączenie DOX z nanorurkami węglowymi. Wielościenne nanorurki węglowe funkcjonalizowane za pomocą trójblokowego kopolimeru (Pluronic F127) charakteryzowały się większym rozproszeniem w środowisku wodnym, co pozwoliło na uzyskanie supramolekularnego kompleksu z lekiem przeciwnowotworowym za sprawą oddziaływań

π - π . Autorzy udowodnili wzrost cytotoxyczności DOX w połączeniu z nanorurkami węglowymi względem komórek raka piersi MCF7 niż w przypadku działania samego chemioterapeutyku. Autorzy udowodnili, że zastosowanie MWCNTs ułatwiło dostarczenie leku do chorych tkanek przez bariery biologiczne oraz polepszyło jego aktywność. Skuteczność wykorzystania kompleksu MWCNTs-DOX determinowana była poprzez efektywne i następujące w odpowiednim momencie uwalnianie leku [69]. Hester i inni [70], również zaprezentowali niekowalencyjny kompleks DOX z jednościenneymi nanorurkami węglowymi. Dodatkowo do nanonośnika zawierającego ugrupowania karboksylowe przyłączyli monoklonalne antyciało, jako celowany ligand. Przeprowadzone badania przez autorów udowodniły, że SWCNTs mogą być stosowane do usprawnienia przenoszenia leków przeciwnowotworowych [70]. Efektywność i podwyższoną aktywność DOX adsorbowanej na powierzchni nanorurek węglowych sfunkcjonalizowanych polisacharydem potwierdziła także grupa Hanga [71], modyfikowanych PEG – grupa Liu [72], zaś amfifilowym kopolimerem PEG₄₄ PPS₂₀ – grupa Crescenzo [73].

Paklitaksel, także z powodzeniem adsorbowany jest na powierzchni odpowiednio modyfikowanego nanonośnika. Tian wraz ze współpracownikami [74] „osadzili” PTX na powierzchni nanorurek węglowych poprzez oddziaływania π - π . MWCNTs wstępnie zmodyfikowano, aby układ MWCNTs-PTX był skuteczny względem komórek nowotworowych. Funkcjonalizacja obejmowała kowalencyjne przyłączenie polietylenoiminy do utlenionej powierzchni nanonośnika i następnie utworzenie wiązania amidowego pomiędzy sfunkcjonalizowanymi MWCNTs a kwasem foliowym, jako celowanym ligandem. Przeprowadzone przez badaczy analizy wykazały wzrost rozpuszczalności leku przenoszonego w układzie MWCNTs-PTX oraz docieranie chemioterapeutyku tylko do komórek nowotworowych. Paklitaksel przenoszony za pomocą sfunkcjonalizowanych nanorurek węglowych wykazywał większą aktywność *in vitro* w porównaniu do terapii wykorzystującej sam lek. Polepszenie właściwości cytotoxycznych pozwala na stwierdzenie, że właściwie zmodyfikowane CNTs są odpowiednimi nośnikami leków przeciwnowotworowych [74].

Adsorpcja kompleksów platyny związana jest ze stabilnością ligandów azotowych i mobilnością jonów chlorkowych. Pozytywnie naładowany akwakompleks cisplatyny jest dzięki temu silnie adsorbowany na nanonośnikach. Adsorpcja cisplatyny w dużej mierze zależy od oddziaływań elektrostatycznych [75]. Grupa badawcza Barrouga [76] zajmowała się adsorpcją cisplatyny na nanonośnikach. Autorzy wykazali wzrost adsorpcji leku na powierzchni nośnika oraz nieznaczny wzrost szybkości uwalniania leku wraz z temperaturą. Cytotoxyczność chemioterapeutyku testowana była *in vitro* na komórkach nowotworowych kostniakomięsaka linii K8. Oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy cisplatyną a powierzchnią nanozastki nie wpłynęły na pogorszenie aktywności stosowanego chemioterapeutyku. Li i współpracownicy [77] adsorbowali cisplatynę na nanoczastkach hydroksyapatytu (Fe5, Fe/Ca=5%). Dodatkowo wykonali próbę porównawczą umieszczając uzyskany kompozyt DDP-Fe5 wewnątrz mikrosfery PLGA. Lek uwalniany był zdecydowanie szybciej z DDP-Fe5 (25 dni) niż z DDP-Fe5-PLGA (55 dni). Kom-

pozyt Fe5/PLGA charakteryzował się korzystnymi właściwościami pozwalającymi na odpowiednie uwalnianie DDP w porównaniu do samego polimeru, co wpłynęło obiecująco na zastosowanie tej nowej formy cisplatyny. Analog cisplatyny jakim jest karboplatyna wprowadziła na powierzchnię nanorurek węglowych grupa Haase [78]. Proces adsorpcji leku okazał się pomyślny, ponieważ chemioterapeutyk skutecznie hamował wzrost guza. Efektywność przenoszonego leku była większa w porównaniu do zastosowania „samej” karboplatyny.

Mimo wielu literaturowych opisów oddziaływań elektrostatycznych leków przeciwnowotworowych z nanonośnikami, w praktyce bardziej preferowane są wiązania kowalencyjne, ze względu na możliwość kontrolowania ilości oraz orientacji łączonych indywiduów podczas prowadzenia reakcji [66].

PODSUMOWANIE

Opisane powyżej sposoby wprowadzania leków przeciwnowotworowych na powierzchnię nanonośników to tylko nieznaczna grupa możliwości. W literaturze spotyka się także m.in. jonowe kompleksy cytostatyków z nośnikami, np. cisplatyny z nanocząsteczką syntetyzowaną na bazie kwasu hialuronowego [79] czy doksorubicyny z kompleksem bloku jonomerowego i surfaktantem [80]. Autorzy udowodnili, że zastosowane przez nich nanonośniki są odpowiednimi układami do przenoszenia i dystrybucji leków przeciwnowotworowych [79, 80].

Funkcjonalizacja kowalencyjna nanonośników za pomocą 1,3-dipolarnej cykloaddycji jest szeroko stosowanym mechanizmem w biokoniuagacji ugrupowań niezbędnych do przenoszenia terapeutyków. Terminalne grupy aminowe na powierzchni nanonośników stanowią idealne, reaktywne centra do przyłączenia cząsteczek funkcyjnych [81]. Pastorin wraz ze współpracownikami zaprezentowali wykorzystanie reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji w celu funkcjonalizacji MWCNTs i wygenerowania odpowiednich grup łączących się z uaktywnionymi ugrupowaniami karboksylowymi leku – metotreksatem. Opisane połączenie zmniejszyło wewnątrzkomórkową barierę wychwytu czynnika cytotoksycznego i zwiększyło efektywność działania [18].

Ciekawe wydają się być połączenia dwóch leków przeciwnowotworowych z jednym nanonośnikiem. Kilka nośników leków wykazuje charakterystyczne właściwości pozwalające na łączenie różnych chemioterapeutyków, np. nanocząstki polimerowe, liposomy. Celem metodyki jest konkurencyjne dostarczanie chemioterapeutyków do komórek nowotworowych i jednoczesny wzrost efektywności terapii. Ważne jest, aby leki łączone były za pomocą wiązań łatwo podlegających hydrolizie w celu niezależnego gromadzenia leków wewnątrz komórek nowotworowych po ich uwolnieniu [11]. Metodyka bazująca na dostarczaniu większej ilości leków na jednym nanonośniku może wpływać na zniesienie oporności lekowej i skutkować zdolnością do regulowania odpowiedniej i wystarczającej dawki dostarczanego chemioterapeutyku [82].

Aryal wraz ze współpracownikami [11] zaprezentowali gromadzenie połączonych kowalencyjnie leków przeciwnowotworowych: paklitakselu z chlorowodorkiem gemcytabiny (GEM) na powierzchni nanocząstki. Podczas biokoniugacji leków autorzy musieli zmierzyć się z problemem różnicy hydrofobowości pomiędzy chemioterapeutykami. Paklitaksel modyfikowano poprzez przekształcenie najbardziej reaktywnej grupy hydroksylowej 2'-OH na karboksylową i następnie wprowadzono bezwodnik glutarowy (GA). Grupa karboksylowa związku pośredniego reagowała następnie z GEM. Cytotoksyczność leków w porównaniu do ich wolnych odpowiedników znacznie wzrosła względem guza prostaty XPA3 [11]. Podobne strategie mogą być także stosowane dla innych rodzajów i połączeń leków, tak jak zaprezentowali Hang i inni łącząc doksorubicynę z docetaksem [82].

WNIOSKI

Synteza nowoczesnych systemów dostarczania leków okazuje się być bardzo ważna w dostarczaniu chemioterapeutyków. Użycie nanonośników umożliwia osiągnięcie znacznie większej aktywności leków w porównaniu do ich samodzielnego działania. Nanonośniki całkowicie izolują cząsteczki leku przed środowiskiem biologicznym, co minimalizuje degradację enzymatyczną chemioterapeutyku [7]. Zastosowanie nanonośników w celu dostarczania leków zwiększa ich rozpuszczalność i jednocześnie wydłuża czas dystrybucji w obiegu krwionośnym. Przełamuje typowe bariery biologiczne takie jak krew-mózg, co umożliwia docieranie leku w miejsca słabo dostępne dla klasycznej chemioterapii. Nowatorski system dostarczania leków w postaci celowany ligand-nanonośnik-lek spełnia wszystkie wymagania efektywnego i bezpiecznego leczenia przeciwnowotworowego: stężenie przenieszonego leku jest adekwatne w organizmie i zapewnia efektywną dawkę; cytotoksyczność chemioterapeutyku jest wysoka w stosunku do komórek nowotworowych [83]. Dostarczanie leków za pomocą nanonośników otwiera drogę do leczenia chorób charakteryzujących się tzw. opornością wielolekową [6].

Lek może być gromadzony na powierzchni nanonośnika bądź w jego wnętrzu. Odpowiednia modyfikacja nośników pozwala na chemiczną biokoniugację leku w wyniku tworzenia grup m.in.: amidowej, estrowej, disiarczkowej czy *N*-acetylohydrazonu. Każdy typ reakcji wymaga wstępnego przygotowania powierzchni nanonośnika poprzez wygenerowanie odpowiednich grup funkcyjnych zapewniających możliwość danego połączenia. Proces syntezy lek-nanonośnik uzależniony jest także w dużej mierze od struktury stosowanego chemioterapeutyku. Możliwe jest także niekowalencyjne oddziaływanie nanonośnika z czynnikiem cytotoksycznym, które jednak nie zapewnia zbyt dużej stabilności połączenia oraz ilościowej kontroli gromadzonych cząsteczek leku.

Aktualne badania nad funkcjonalizacją nanonośników celowanymi ligandami (przeciwciałami, kwasem foliowym, białkami) oraz lekami cytostatycznymi pozwalają na selektywne dostarczenie odpowiedniego stężenia chemioterapeutyku

do konkretnej komórki nowotworowej [9, 31]. Na podstawie przytoczonych przykładów zarówno w części I pracy jak i II można stwierdzić, że celowana terapia przeciwnowotworowa stanowi przyszłościowy kierunek rozwoju leczenia chorób nowotworowych.

Praca jest finansowana z grantu NCN DEC-2011/01/B/ST5/01192.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] R. Panchagnula, *Int. J. Pharm.*, 1998, **172**, 1.
- [2] L. Brannon-Peppas, J.O. Blanchette, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2004, **56**, 1649.
- [3] R. Sinha, G.J. Kim, S. Nie, D.M. Shin, *Mol. Cancer Ther.*, 2006, **5**, 1909.
- [4] A. Bianco, K. Kostarelos, C.D. Partidos, M. Prato, *Chem. Commun.*, 2005, **5**, 571.
- [5] L. Juillerat-Jeanneret, *Drug Discov. Today*, 2008, **13**, 1099.
- [6] D. Peer, J.M. Karp, S. Hong, O.C. Farokhzad, R. Margalit, R. Langer, *Nature Nanotech.*, 2007, **2**, 751.
- [7] V. Torchilin, Imperial College Press, London, 2006, **1**, 1.
- [8] G.A. Hughes, *Nanomedicine: Nanotechn., Biol. Med.*, 2005, **1**, 22.
- [9] D.R. Khan, *J. Cancer Sci. Ther.*, 2010, **2**, 058.
- [10] R. Singh, J.W. Lillard, *Exp. Molec. Path.*, 2009, **86**, 215.
- [11] S. Aryal, C.M.J. Hu, L. Zhang, *Small*, 2010, **13**, 1442.
- [12] K.R. West, S. Otto, *Curr. Drug Disc. Tech.*, 2005, **2**, 123.
- [13] K.M. Werengowska, M. Wiśniewski, A.P. Terzyk, N. Gurtowska, T.A. Drewa, *Wiad. Chem.*, 2011, **65**, 887.
- [14] E. Pawełczyk, M. Zając, *Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego, Poznań*, 1995, **5–7**, 340.
- [15] G. Minotti, P. Menna, E. Salvatorelli, G. Cairo, L. Gianni, *Pharmacol. Rev.*, 2004, **56**, 185.
- [16] J. Verweij, M. Clavelf, B. Chevalier, *Annals of Oncology*, 1994, **5**, 495.
- [17] L.M. Pasetto, M.R. D'Andrea, A.A. Brandes, E. Rossi, S. Monfardini, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2006, **60**, 59.
- [18] G. Pastorin, W. Wu, S. Wieckowski, J.P. Briand, K. Kostarelos, M. Prato, A. Bianco, *Chem. Commun.*, 2006, **11**, 1182.
- [19] Y. Ren, G. Pastorin, *Adv. Mater.*, 2008, **20**, 2031.
- [20] A. Sparreboom, C.D. Scripture, V. Trieu, *Clin. Cancer Res.*, 2005, **11**, 4136.
- [21] L. Kelland, *Nature Rev.*, 2007, **7**, 573.
- [22] C. Tripisciano, E. Borowiak-Palen, *Phys. Stat. Sol. (b)*, 2008, **10**, 1979.
- [24] K. Malinowska, R. Modranka, J. Kędziora, *Pol. Merk. Lek.*, 2007, **23**, 165.
- [25] A.A. Bhirde, A.A. Sousa, V. Patel, A.A. Azari, J.S. Gutkind, R.D. Leapman, J.F. Rusling, *Nanomedicine (Lond)*, 2009, **4**, 763.
- [26] A. Sparreboom, K. Nooter, J. Verweij, John Wiley & Sons, Ltd., 2002, **84E**, 1333.
- [27] E. Czeczuga-Semeniuk, S. Wołczyński, M. Dąbrowska, J. Dzieciół, T. Anchim, *Folia Histochem. Cytobiol.*, **42**, 221.
- [28] H.S. Yoo, K.H. Lee, J.E. Oh, T.G. Park, *J. Control. Release*, 2000, **68**, 419.
- [29] H.S. Yoo, J.E. Oh, K.H. Lee, T.G. Park, *Pharm. Res.*, 1999, **16**, 1114.
- [30] S.K. Vashist, D. Zheng, G. Pastorin, K. Al-Rubeaan, J.H.T. Luong, F.S. Sheu, *Carbon*, 2011, **49**, 4077.

- [31] T.A. Hilder, J.M. Hill, Small, 2009, **5**, 300.
- [32] M. Yudasaka, K. Ajima, K. Suenaga, T. Ichihashi, A. Hashimoto, S. Iijima, Chem. Phys. Lett., 2003, **380**, 42.
- [33] C. Tripisciano, K. Kraemer, A. Taylor, E. Borowiak-Palen, Chem. Phys. Lett., 2009, **478**, 200.
- [34] C. Tripisciano, S. Costa, R.J. Kalenczuk, E. Borowiak-Palen, Eur. Phys. J. (b), 2010, **75**, 141.
- [35] E.C. Gryparis, M. HatziaPOSTOLOU, E. Papadimitriou, K. Avgoustakis, Eur. J. Pharm Biopharm., 2007, **67**, 1.
- [36] N. Nishiyama, K. Kataoka, J. Control. Release, 2001, **74**, 83.
- [37] Y. Mizumura, Y. Matsumura, T. Hamaguchi, N. Nishiyama, K. Kataoka, T. Kawaguchi, W.J.M. Hrushesky, F. Moriyasu, T. Kakizoe, Jpn. J. Cancer Res., 2001, **92**, 328.
- [38] A. Schroeder, R. Honen, K. Turjeman, A. Gabizon, J. Kost, Y. Barenholz, J. Control. Release, 2009, **137**, 63.
- [39] M.S. Newman, G.T. Colbern, P.K. Working, C. Engbers, M.A. Amantea, Cancer Chemother. Pharmacol., 1999, **43**, 1.
- [40] S. Hampel, D. Kunze, D. Haase, K. Kramer, M. Rauschenbach, M. Ritschel, A. Leonhardt, J. Thomas, S. Oswald, V. Hoffmann, B. Buchner, Nanomedicine (Lond), 2008, **3**, 175.
- [41] S. Mitra, U. Gaur, P.C. Ghosh, A.N. Maitra, J. Control. Release, 2001, **74**, 317.
- [42] F. Lince, S. Bolognesi, B. Stella, D.L. Marchisio, F. Dosio, Chem. Eng. Res. Des., 2011, **89**, 2410.
- [43] H. Park, J. Yang, J. Lee, S. Haam, I.H. Choi, K.H. Yoo, ACS Nano, 2009, **3**, 2919.
- [44] Y. Matsumura, M. Gotoh, K. Muro, Y. Yamada, K. Shirao, Y. Shimada, M. Okuwa, S. Matsumoto, Y. Miyata, H. Ohkura, K. Chin, S. Baba, T. Yamao, A. Kannami, Y. Takamatsu, K. Ito, K. Takahashi, Annals of Oncology, 2004, **15**, 517.
- [45] A.A. Gabizon, Cancer Invest., 2001, **19**, 424.
- [46] K. Kataoka, T. Matsumoto, M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, S. Fukushima, K. Okamoto, G.S. Kwon, J. Control. Release, 2000, **64**, 143.
- [47] J.M. Koziara, P.R. Lockman, D.D. Allen, R.J. Mumper, J. Control. Release, 2004, **99**, 259.
- [48] G. Ruan, S.S. Feng, Biomaterials, 2003, **24**, 5037.
- [49] C. Fonseca, S. Simões, R. Gaspar, J. Control. Release, 2002, **83**, 273.
- [50] T. Hamaguchi, K. Kato, H. Yasui, C. Morizane, M. Ikeda, H. Ueno, K. Muro, Y. Yamada, T. Okusaka, K. Shirao, Y. Shimada, H. Nakahama, Y. Matsumura, Br. J. Cancer, 2007, **97**, 170.
- [51] T.Y. Kim, D.W. Kim, J.Y. Chung, S.G. Shin, S.C. Kim, D.S. Heo, N.K. Kim, Y.J. Bang, Clin. Cancer Res., 2004, **10**, 3708.
- [52] Z. Liu, J.T. Robinson, S.M. Tabakman, K. Yang, H. Dai, Materials Today, 2011, **14**, 316.
- [53] C. Li, R.A. Newman, Q.P. Wu, S. Ke, W. Chen, T. Hutto, Z. Kan, M.D. Brannan, C.C.S. Wallace, Cancer Chemother. Pharmacol., 2000, **46**, 416.
- [54] L. Milas, K.A. Mason, N. Hunter, C. Li, and S. Wallace, Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys., 2003, **55**, 707.
- [55] T. Etrych, T. Mrkvan, P. Chytil, C. Koňák, B. Říhová, K. Ulbrich, J. Appl. Polymer Sci., 2008, **109**, 3050.
- [56] M. Hrubý, C. Koňák, K. Ulbrich, J. Control. Release, 2005, **103**, 137.
- [57] D. Vetvicka, M. Hrubý, O. Hovorka, T. Etrych, M. Vetrík, L. Kovar, M. Kovar, K. Ulbrich, B. Rihova, Bioconjugate Chem., 2009, **20**, 2090.
- [58] H.S. Yoo, E.A. Lee, T.G. Park, J. Control. Release, 2002, **82**, 17.
- [59] S. Aryal, C.M.J. Hu, L. Zhang, ACS Nano., 2010, **4**, 251.
- [60] E. Tsai, Cosmos, 2011, **8**, 1.
- [61] P.C.A. Rodrigues, K. Scheuermann, C. Stockmar, G. Maier, H.H. Fiebig, C. Unger, R. Mülhaupt, F. Kratza, Bioor. Med. Chem. Lett., 2003, **13**, 355.
- [62] R.P. Feazell, N. Nakayama-Ratchford, H. Dai, S.J. Lippard, J. Am. Chem. Soc., 2007, **129**, 8438.

- [63] Z. Liu, K. Chen, C. Davis, S. Sherlock, Q. Cao, X. Chen, H. Dai, *Cancer Res*, 2008, **68**, 6652.
- [64] P.S. Lai, P.J. Lou, C.L. Peng, C.L. Pai, W.N. Yen, M.Y. Huang, T.H. Young, M.J. Shieh, *J. Control. Release*, 2007, **122**, 39.
- [65] J. Chen, S. Chen, X. Zhao, L.V. Kuznetsova, S.S. Wong, I. Ojima, *J. Am. Chem. Soc.* 2008, **130**, 16778.
- [66] L. Wang, W. Zhao, W. Tan, *Nano Res.*, 2008, **1**, 99.
- [67] K. Kataoka, T. Matsumoto, M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, S. Fukushima, K. Okamoto, G.S. Kwon, *J. Control. Release*, 2000, **64**, 143.
- [68] K. Greish, T. Sawa, J. Fang, T. Akaike, H. Maeda, *J. Control. Release*, 2004, **97**, 219.
- [69] H. Ali-Boucetta, K.T. Al-Jamal, D. McCarthy, M. Prato, A. Biancoci, K. Kostarelos, *Chem. Commun.*, 2008, **4**, 459.
- [70] E. Heister, V. Neves, C. Tilmaciu, K. Lipert, V. Sanz Beltrán, H.M. Coley, S.R.P. Silva, J. McFadden, *Carbon*, 2009, **47**, 2152.
- [71] X. Zhang, L. Meng, Q. Lu, Z. Fei, P.J. Dyson, *Biomaterials*, 2009, **30**, 6041.
- [72] Z. Liu, X. Sun, N. Nakayama-Ratchford, H. Dai, *ACS Nano*, 2007, **1**, 50.
- [73] A. Di Crescenzo, D. Velluto, J.A. Hubbell, A. Fontana, *Nanoscale*, 2011, **3**, 925.
- [74] Z. Tian, Y. Shi, M. Yin, H. Shen, N. Jia, *Nano Biomed. Eng.*, 2011, **3**, 155.
- [75] B. Palazzo, M. Iafisco, M. Laforgia, N. Margiotta, G. Natile, C.L. Bianchi, D. Walsh, S. Mann, N. Roveri, *Adv. Funct. Mater.*, 2007, **17**, 2180.
- [76] A. Barroug, L.T. Kuhn, L.C. Gerstenfeld, M.J. Glimcher, *J Orthop. Res.*, 2004, **22**, 703.
- [77] Y. Li, S. Lim, C.P. Ooi, *Pharm. Res.*, 2012, **29**, 756.
- [78] M. Arlt, D. Haase, S. Hampel, S. Oswald, A. Bachmatiuk, R. Klingeler, R. Schulze, M. Ritschel, A. Leonhardt, S. Fuessel, B. Büchner, K. Kraemer and M.P. Wirth, *Nanotechnology*, 2010, **21**, 1.
- [79] Y.I. Jeong, S.T. Kim, S.G. Jin, H.H. Ryu, Y.H. Jin, T.Y. Jung, I.Y. Kim, S. Jung, *J. Pharm. Sci.*, 2008, **97**, 1268.
- [80] T.K. Bronich, A. Nehls, A. Eisenberg, V.A. Kabanov, A.V. Kabanov, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 1999, **16**, 243.
- [81] M. Foldvari, M. Bagonluri, *Nanomedicine: Nanotechn., Biol. Med.*, 2008, **4**, 183.
- [82] L. Zhang, A.F. Radovic-Moreno, F. Alexis, F.X. Gu, P.A. Basto, V. Bagalkot, S. Jon, R.S. Langer, O.C. Farokhzad, *ChemMedChem*, 2007, **2**, 1268.
- [83] E.S. Kawasaki, A. Player, *Nanomedicine: Nanotechn., Biol. Med.*, 2005, **1**, 101.

Praca wpłynęła do Redakcji 5 czerwca 2012

**DROGA POD SŁOŃCE.
WCZESNA HISTORIA WITAMINY D**

THE ROUTE AGAINST THE SUN.
EARLY HISTORY OF VITAMIN D

Jerzy Wicha

*Instytut Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk,
ul. Kasprzaka 44/52, 01-224 Warszawa
e-mail: jerzy.wicha@icho.edu.pl*

Abstract

1. Podstawowe wiadomości o witaminach D
2. Pierwsze obserwacje
3. Tropem światła
4. Złoty wiek chemii
5. Trudna historia

Piśmiennictwo cytowane



prof. dr. hab. Jerzy Wicha studiował chemię na uniwersytetach w Odessie i w Moskwie. Stopień mgr chemii uzyskał w 1958 r. (Uniwersytet Moskiewski), dra w 1964 r. (Uniwersytet Warszawski) i dra hab. w 1970 r. (Uniwersytet Warszawski). Studia podoktorskie odbył w Worcester Foundation for Experimental Biology (USA) oraz University of Oxford. Od 1970 r. pracuje w Instytucie Chemii Organicznej PAN na stanowisku docenta a następnie profesora nadzwyczajnego (od 1980 r.) i zwyczajnego (od 1992 r.). Okresowo był zatrudniony jako wizytujący pracownik badawczy lub profesor m.in. na The University of Chicago, The University of Wisconsin-Madison i Cape Town University.

Specjalność: chemia produktów naturalnych (w szczególności steroidów), synteza totalna, metody syntezy. Uzyskał szereg wyróżnień, m.in. Medal Stanisława Kostaneckiego oraz wyróżnienie im. Bronisława Znatowicza Polskiego Towarzystwa Chemicznego.

ABSTRACT

Two natural products are called „vitamin D”: (1) vitamin D₃ which is biosynthesized in humans and animals and (2) vitamin D₂ which is generated in photochemical rearrangement of a sterol of fungus – ergosterol (Fig. 1 and 2). The vitamins D are further metabolized (Scheme 1) first into 25-hydroxy- and then into 1 α ,25-dihydroxy derivatives in various tissues. The compounds control the calcium transport and act as a cell growth regulator important for tumor prevention.

The early history of vitamin D stems from outburst of rickets at the beginning of the industrialization era. Rickets was a child bond disease that often led to a permanent disability. A comprehensive description of the rickets was presented by D. Whistler (1619–1684) and then F. Glisson (1597–1677) and coauthors. Jędrzej Śniadecki (1768–1838) was the first who associated the rickets with the sunlight. In his book “On the Physical Education of Children” Śniadecki stated that exposition of a child’s body to a direct action of sunlight is the most efficient method for the prevention and the cure of rickets (Illustrations 1 and 2). T. A. Palm in 1890 observed that the rickets is rare in countries where sunshine is abundant and prevalent whenever there is a little of sunlight. The first experimental evidence on the sunlight effects in rickets were presented by J. Raczyński in 1912 who postulated that the sunlight affects metabolic processes in blood related to calcium transport (Illustration 3 and 4). E. Mellanby showed (1919) that the disease is connected to the lack of certain dietary factors and he recommended the use of cod liver – oil. K. Huldschinsky experimentally proved that UV irradiation cures the rickets. The Mellanby’s and Huldschinsky’s observations were confirmed by clinical studies in 1922.

E.V. McCollum has developed efficient methods for “biological analysis” of food and named anti-rachitic factor as vitamin D. H. Steenbock and A.F. Hess in 1924 found independently that various food products gain anti-rachitic properties after being irradiated with a UV lamp. A.F. Hees and A. Windaus showed that irradiation of ergosterol affords a product with high anti-rachitic activity.

In 1919 the first structure for cholesterol has been proposed by A. Windaus (Scheme 2, Fig. 3) and then with contribution of H. Wieland it was modified to the “Wieland-Windaus” structure (1928, Nobel Price lectures, Fig. 4). O. Diels’ investigation on dehydration of cholesterol (Fig. 5) and J.D. Bernal’s crystallographic measurements of ergosterol challenged the Wieland-Windaus structure. Finally, the correct structure for cholic acid and sterols was deduced by O. Rosenheim and H. King (Fig. 6).

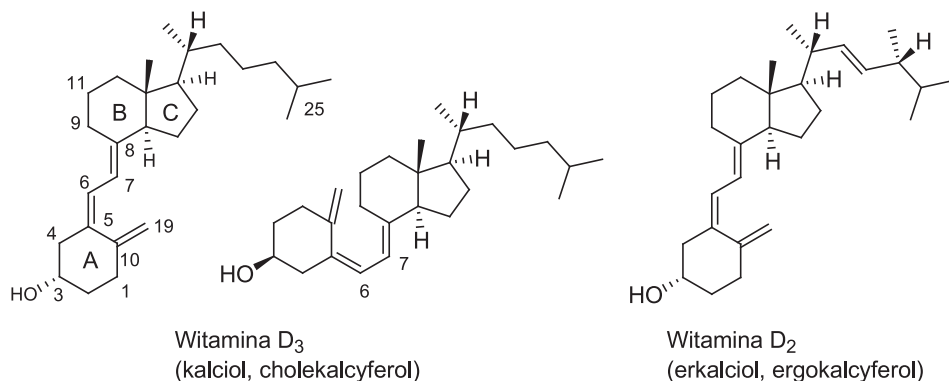
In 1932 crystalline vitamin D₂ was prepared in the Windaus laboratory (Scheme 3). In 1935 vitamin D₃ was isolated from a fish-oil and the same compound was synthesized from cholesterol (Illustration 5). The structure of vitamin D₂ was elucidated by Windaus in 1935 (Illustration 6) and confirmed by X-ray studies in 1948. Scientific contributions of Adolf Windaus are associated with his highest ethical standards and non-conformist political position in the national-socialist age.

Keywords: history, vitamin D, biosynthesis vs. nutrition, sterols, structural investigations, ultraviolet light, anti-rachitic diet

Słowa kluczowe: historia, witaminy D, biosynteza i żywienie, sterole, badanie struktury, światło ultrafioletowe, dieta przeciwrzywcza

1. PODSTAWOWE WIADOMOŚCI O WITAMINACH D

Dwa związki pochodzenia naturalnego noszą łączną nazwę „witamina D”: witamina D₃ (kalcioł, cholekalcyferol) oraz witamina D₂ (ergokalcioł, ergokalcyferol, kalcyferol). Cząsteczki witaminy D₃ i D₂ różnią się tylko budową łańcucha bocznego, jak zaznaczono we wzorach (Rys. 1, dla witaminy D₃ podano również wzór energetycznie bogatszego rotameru utworzonego przez obrót o 180° wokół wiązania C-6-C-7). Są to trójcykliczne alkohole, a ich znamioną cechą jest obecność układu sprzężonego trienu. W organizmie ludzkim witaminy D₃ i D₂ mają zbliżoną aktywność biologiczną.

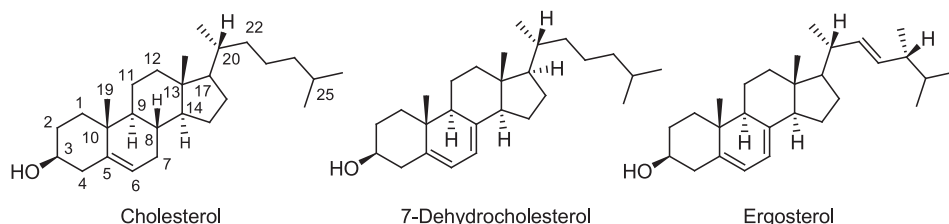


Rysunek 1. Wzory witamin D₃ i D₂

Figure 1. Structural formulas of vitamin D₃ and D₂

Prekursorem witaminy D₃ jest 7-dehydrocholesterol (prowitamina D₃) (Rys. 2) będący pochodną cholesterolu – głównego sterolu w organizmach zwierząt (zosterole). Cholesterol pełni wiele funkcji fizjologicznych i stanowi ważne ogniwo w biosyntezie szeregu mediatorów procesów biologicznych, m.in. kwasów żółciowych, hormonów płciowych, hormonów kory nadnercza. W czystej postaci został wydzielony z kamieni żółciowych i opisany w końcu XVII w. (Chevreul). Witamina D₃ jest wytwarzana w organizmach zwierząt z jednostek octanowych, a także pobierana z pożywienia. Ścieżka biosyntezy obejmuje fotochemiczne przegrupowanie prowitaminy indukowane promieniami ultrafioletowymi spektrum słonecznego (280–350 nm).

Witamina D₂ tworzy się w drodze fotochemicznego przegrupowania ergosterolu (Rys. 2), który jest podstawowym sterolem biosyntetyzowanym w organizmach grzybów i drożdży (mykosterole) będącym także często spotykanym ubocznym składnikiem steroli roślin (sitosterole) i innych produktów naturalnych izolowanych z roślin. Ergosterol został wydzielony ze sporyszu ryżu i po raz pierwszy opisany przez paryskiego aptekarza Charlesa Tanreta w 1889 r. Organizmy zwierzęce mogą przyjmować witaminę D₂ z pożywienia.

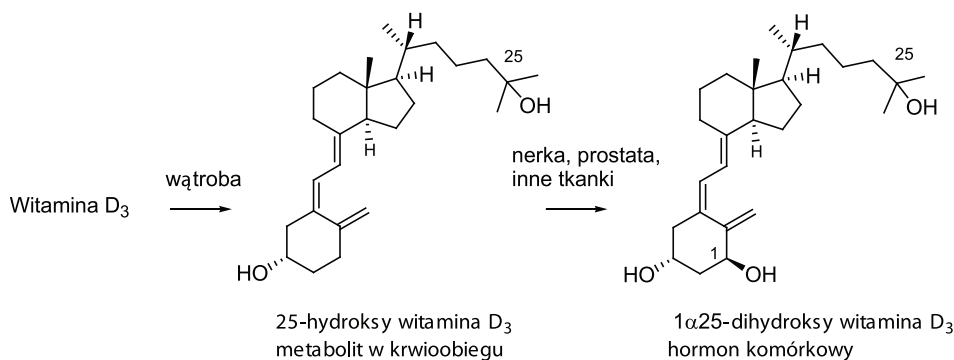


Rysunek 2. Wzory cholesterolu, 7-dehydrocholesterolu (prowitamina D_3) oraz ergosterolu (prowitamina D_2)
 Figure 2. Structural formulas of cholesterol, 7-dehydrocholesterol (provitamin D_3) and ergosterol (provitamin D_2)

Fotochemiczna biosynteza witaminy D_3 w warunkach fizjologicznych przebiega w zewnętrznych warstwach skóry ludzkiej [1]. W umiarkowanej strefie klimatycznej, w lecie, kilkanaście minut działania słońca na ręce i twarz może wystarczyć do wytworzenia witaminy D_3 w ilości wystarczającej do pokrycia osobniczego dziennego zapotrzebowania, które szacuje się na 10 μg [2, 3]. Proces biosyntezy nie jest tak efektywny u osób o ciemnej karnacji skóry, a także u ludzi starszych i wiele poradników medycznych zaleca suplementację, np. zalecenia Health Kanada [4] przedstawiają się następująco: dla osób w wieku 19–50 lat – 5 μg [5 μg = 200 IU (international units)], 51–70 lat – 10 μg (400 IU) a tych mających 71 i więcej lat 15 μg (600 IU). W okresach braku oświetlenia słonecznego może być konieczne przyjmowanie większych dawek witaminy D_3 w zakresie 25–50 μg (1000–2000 IU). Odnosnie diety to szacuje się, że tłuste ryby, takie jak łosoś, makrela lub śledź, jak również suszone w słońcu grzyby, zawierają 300–500 IU witaminy D_3 lub D_2 na porcję. Obecnie dysponujemy metodami analitycznymi pozwalającymi oznaczyć poziom witamin D w organizmie i ewentualnie, zakres suplementacji.

W większych dawkach witamina D_3 jest toksyczna. Objawy toksyczności odnotowano u pewnych osób już przy spożyciu 5 000 IU dziennie wówczas, gdy inne nie wykazują objawów toksyczności przy 20 000 IU. Należy odnotować, że proces fotochemicznego generowania witaminy w skórze jest wyposażony w mechanizmy samoregulujące zapobiegające przedawkowaniu i efektom toksycznym.

We wczesnych latach 1970-tych ustalono [5–7], że witamina D_3 ulega dalszym przemianom metabolicznym (Schemat 1). Najpierw w wyniku utlenienia z udziałem cytochromu P-450, głównie w wątrobie, tworzy się 25-hydroksy witamina D_3 (kalcidiol). Jest to podstawowa postać witaminy D obecna w krwiobiegu. Następnie kalcidiol ulega specyficznej 1α -hydroksylacji z utworzeniem $1\alpha,25$ -dihydroksy witaminy D_3 (kalcitriolu). Dopiero ten ostatni związek jest czynną postacią witaminy D oddziaływującą z receptorami. W analogiczny sposób przebiega metabolizm witaminy D_2 .

Schemat 1. Metaboliczne przemiany witaminy D₃Scheme 1. Metabolic transformations of vitamin D₃

Do niedawna uważano, że 1 α -hydroksylacja przebiega specyficznie w nerce, a podstawową funkcją ostatecznego metabolitu jest kontrola gospodarki wapniowej. Obecnie zgromadzono dowody na to, że calcitriol jest wytwarzany w wielu typach komórek, m.in. w prostaty, jelicie grubym, sutku. Uważa się, że pełni on funkcje hormonu komórkowego i regulatora wzrostu komórek niezwykle ważnego dla zapobiegania zwyrodnieniom nowotworowym [8].

Zakres leczniczych i profilaktycznych zastosowań witamin D ulega ustawicznemu poszerzaniu [9, 10]. Jednak odkrycie i barwna historia badań nad tymi bioregulatorami związane są z przyswajaniem wapnia i krzywicą, chorobą obecnie w znacznym stopniu już opanowaną.

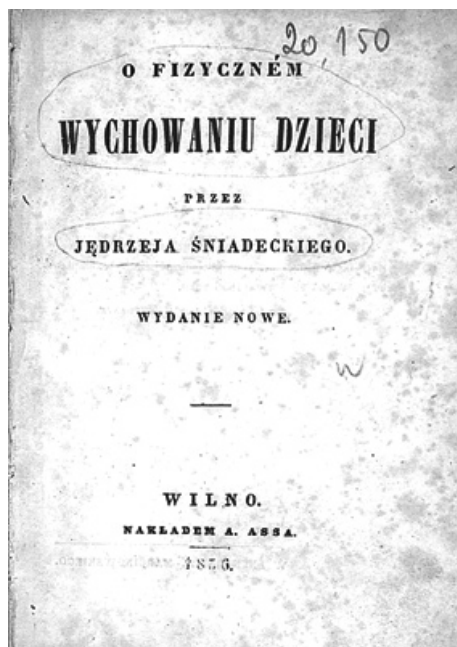
2. PIERWSZE OBSERWACJE

Krzywica pojawiła się jako choroba społeczna w połowie XVIII w. „Epidemię” obserwowano w Anglii na obszarach południowo-zachodnich, gdzie burzliwie rozwijał się przemysł tkacki i handel wełną. Pierwszy szczegółowy opis choroby został zawarty w dysertacji „De morbo puerili anglorum, quem patrio idioma indigande vocant the Rickets” (O chorobie dzieci angielskich, którą w mowie miejscowej nazywa się the Rickets) Daniela Whistlera (1619–1684), lekarza kształconego w Oxford i Leiden. Wkrótce potem ukazało się, najpierw po łacinie a później i w przekładzie angielskim, obszerne dzieło poświęcone krzywicy opracowane przez Francisca Glissona (1597–1677) i współautorów z College of Physicians w Londynie, George’a Bate i Assuerusa Regimortera. „Choroba angielska” (ang. *English disease*, *rickets* lub *rachitis*) została rozpoznana jako dziecięca choroba kości o poważnych skutkach dla całego organizmu, która często prowadzi do trwałego kalectwa [11].

Stosunkowo wcześniej odnotowano, że na chorobę angielską zapadają głównie dzieci ze średnich i wyższych warstw społecznych, wychowywane we względnym dostatku. Mimo prawidłowego rozpoznania nie znaleziono remedium na tę cho-

robę, a np. John Floyer w 1702 r. zalecał zimne kąpiele, a nawet uważał, że zanurzenie niemowlęcia w zimnej wodzie podczas chrztu może mieć działanie zapobiegawcze. „Złe powietrze” uważano powszechnie za jedną z przyczyn epidemii. Z dzisiejszej perspektywy wiemy, że zadymienie, zapylenie i tzw. smog powodują odcięcie części spektrum promieniowania słonecznego ważnej dla biosyntezy witamin D.

Francuski medyk Levacher de la Feutrie (1738–1790) opisał przebieg i rozmaite postaci krzywicy, diagnozę i ogólne rokowania dla chorych, a także konstrukcję ortopedycznych przyrządów, protez, gorsetów, itp., ułatwiające funkcjonowanie jej ofiarom.



Ilustracja 1. Jędrzej Śniadecki „O Fizycznym Wychowaniu Dzieci”, Wilno, 1856 r., strona tytułowa
 Illustration 1. Jędrzej Śniadecki “On the Physical Education of Children”, Wilno, 1856, the title page

Pierwsze racjonalne spostrzeżenia na temat przyczyn choroby poczynił Jędrzej Śniadecki (1768–1838) kształcony w Krakowie, a także w Pawii i Edynburgu profesor chemii i farmacji w Głównej Szkole Litewskiej (później Uniwersytet Wileński), lekarz, mistrz medycyny społecznej i niez mordowany propagator higieny. Śniadecki uważnie analizował europejskie statystyki lekarskie, a wskazywały one na zgubny wpływ miast i wielkich skupisk ludzkich na stan zdrowia ich mieszkańców. W rozprawie „O fizycznym wychowaniu dzieci” datowanej z 1822 r. a wydanej najpierw w ramach edycji zbiorowej „Dzieła Jędrzeja Śniadeckiego”, Warszawa, 1840 r. a następnie niezależnie, Sanok, 1855 r. i Wilno, 1856 r. (Historyczne wydanie, Wilno, 1856 r., Ilustracja 1 i Ilustracja 2) pisał [12]:

„Najszczęśliwsze były i dotąd są te kraje, które albo żadnych miast nie miały i nie mają, albo bardzo mało; w takich tylko krajach człowiek zachowuje pierwiastkową swoją dzielność, i właściwą sobie swobodę. Mieszkaniec miasta nie tylko niewieścieje i osłabia się coraz bardziej, ale oswojony ze wszystkimi przygodami życia ludzkiego zatwardza się i staje obojętnym dla drugich; czyli krócej mówiąc, niewieścieje we względzie fizycznym, a w moralnym tygrysem się staje.”

I dalej (str. 34) „Zwyczajna śmiertelność dzieci (nierównie większa niż dorosłych) jest taka, iż w przeciągu pierwszych ośmiu lat z tysiąca narodzonych umiera 464. ... Tymczasem w wielkich miastach umiera połowa przed końcem nie ósmego, ale trzeciego roku; kiedy w szpitalu dzieciennym paryskim umierają przeszło dwie trzecie części w przeciągu pierwszych trzech tygodni.”

234
wój postrzeżono w miastach rękodzielnych
zachodniej części Anglii.

Daje się ona widzieć, a przynajmniej jej początek, od dziewięciu miesięcy, do końca drugiego roku. Rzadko się poczyna później; ale raz poczęta trwa niekiedy lat kilka. A chociaż w wieku dojrzałym ustaje; zostawia wszakże po sobie wszystkie wady, wykrzywienia i szpetności, jakim dała początek. Nadto wielka głowa; ciało miękkie i obwisłe, kości około stawów polorzkie, a w całym ciele miękkie i łatwo się uginające, tudzież krętek duży; stanowią główne cechy tej choroby. Jak skoro więc u dziecięcia głowa nad proporcją jest wielka, a kości około stawów pękate czyli lekko nadryżkłe, o zapobieżeniu wybuchającej już choroby myślić należy; jeżeli się albowiem wykształciła zupełnie, rady lekarza użyć wypada. — Zapobiega się jej sposobem wychowania, a mianowicie jak najwięcej staraniem o oszczędność; częstą odmianą diety, wycieraniem ciała flanelą lub szarotką, i częstym kąpaniem w wodzie zimnej lub stońskiej. Jeżeli dziecię jest przy pierś, a matka młoda, młoda i zdrowa; wiem z doświadczenia własne-

235
go, iż nie tak szczerliwie nie zapobiega zupełnemu rozwinięciu się Angielskiej choroby, jak utrzymanie dziecięcia przy pierś, aż do skończenia drugiego roku. Przeciwnie; jeżeli matka jest chorowita, słaba lub stara; albo ją natychmiast odmienić potrzeba albo dziecię odłączyć.

Przy tym należy z błędzka dziecięcego wyjąć wszystkie piernaty i poduszki pierzane, a użyć natomiast prostych siemichów, lub przynajmniej materaców skorzanych, wbosem albo pilicją wypchanych; a kołdrę i odzienie dać z grubej kuzzał. Jeżeli pora roku pozwala, wypada trzymać dziecię na otwartym powietrzu i pozwolić pełzać na słońcu w piasku lub trawie; jeżeli nie, dać im pełzać w pokoju na posadzce, dywanach lub rogach. Owszem kąpiele piaszczyste w samym stoncznym upale, uważają się za walne w tej dolegliwości lekarstwa. Jeżeli majątek rodziców jest potężny, najlepiej wywieźć dalek na wieś i ehować ile można w suchym, otwartym i czystym powietrzu. Jeżeli nie, należy je przynajmniej nosić lub wozić w wolnym powietrzu, zwłaszcza na słońcu; którego bezpośrednie działanie na

Ilustracja 2. Jędrzej Śniadecki „O Fizycznym Wychowaniu Dzieci”, Wilno, 1856 r., str. 234–235, część opisu objawów krzywicy

Illustration 2. Jędrzej Śniadecki “On the Physical Education of Children”, Wilno, 1856, pp 234–235, part of the symptoms of rickets description

Krzywica była tylko jedną z wielu chorób cywilizacji przemysłowej, ale ważną i coraz bardziej rozpowszechnioną na terenie Polski. Jędrzej Śniadecki spostrzegł, że w miastach dzieci zapadają na nią częściej niż na wsiach (str. 85).

„To atoli pewna, że tylko w domach wygodnie, miękkko, a nade wszystko rozpustnie żyjących natrafić ją można; że nawet w familiach dostatnich nie jest tak pospolita na wsi jak w mieście; że jej nie zna pracowity rolnik ani wiejski rzemieślnik, ale że

już lubi dziatki przykutego – po miastach biednych – do warsztatu rzemieślnika lub wyblakłego i niechlujnego rękodzielnika, dla czego chorobę tę najpierw postrzeżono w miastach rękodzielnych zachodniej części Anglii”.

Zalecenia dla zapobiegania i leczenia rachityzmu zostały sformułowane w sposób następujący: (str. 85)

„Jeżeli pora roku pozwala, wypada trzymać dzieci na otwartym powietrzu i pozwalać pełzać na słońcu w piasku lub trawie; jeżeli nie – dać im pełzać w pokoju na posadzce, dywanach lub rogożach. Owszem, kąpiele piaszczyste w samym słonecznym upale uważają się za walne tej dolegliwości lekarstwa. Jeżeli majątek rodziców jest po temu, najlepiej wywieść dzieci na wieś i chować ile można w suchym, otwartym i czystym powietrzu. Jeżeli nie, należy je przynajmniej nosić lub wozić w wolnym powietrzu, zwłaszcza na słońcu, którego bezpośrednie działanie na ciało nasze do najskuteczniejszych sposobów zapobieżenia tej chorobie i jej wyleczenia policzyć należy”

W przypisie dodanym jako uzupełnienie do wyżej przytoczonych zaleceń czytamy (str. 86, przypis):

„Tak mocny i oczywisty wpływ słońca na wyleczenie choroby angielskiej tudzież jej okazywanie się pospolite po miastach ludnych, gdzie ulice są wąskie i mieszkania rzemieślników źle oświetlone, były powodem, żem tę chorobę porównywałem z wyciekaniem, czyli jak mówimy z francuskiego, etiologiem się roślin. Lecz gdym ją potem w domach dostatnich postrzegł tu i ówdzie na wsi, zdania tego odstąpić musiałem.”

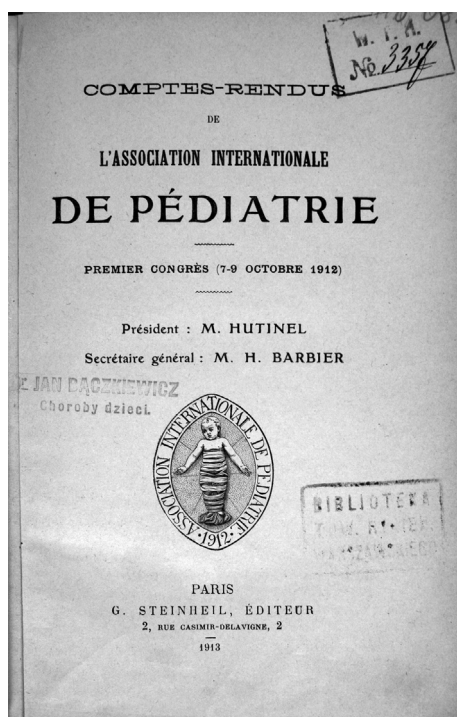
Jednoznaczne wskazanie, że krzywicę należy leczyć przez poddawanie dzieci bezpośredniemu działaniu promieni słonecznych i że brak światła słonecznego jest przyczyną występowania tej choroby miało charakter odkrycia pionierskiego i wyprzedziło o kilka pokoleń rozumienie etiologii tej choroby. W rozmaitych wcześniejszych źródłach wiedzy medycznej wskazywano na korzystny wpływ promieniowania słonecznego, lecz tylko w rozumieniu poprawienia ogólnej kondycji organizmu ludzkiego.

Obszerna rozprawa Śniadeckiego „O fizycznym wychowaniu dzieci” (około 90 str. w wydaniu wznowionym) nie została przetłumaczona na żaden z głównych języków publikacji naukowych, w przeciwieństwie do szerzej rozpowszechnionej „Teorii jestestw organicznych”. Sygnał o historycznie ważnych poglądach Jędrzeja Śniadeckiego dotarł do obiegu międzynarodowego tylko dzięki krótkiej notce Mozolowskiego [13] (Uniwersytet im. Stefana Batorego, Wilno) w czasopiśmie *Nature*, w 1939 r., „Jędrzej Śniadecki (1768–1838) on the Cure of Rickets”. Tym niemniej, priorytet Śniadeckiego uznaje się w części współczesnych monografii na temat krzywicy i witamin D.

Wypada dodać, że dopiero blisko 100 lat później Hess i Unger [14] opublikowali wyniki doświadczeń w nowojorskiej klinice dziecięcej „The Cure of Infantile Rickets by Sunlight”, stanowiące formalne potwierdzenie obserwacji Śniadeckiego (oczywiście bez cytowania).

Angielski lekarz działający w Japonii, Theobald A. Palm, spostrzegł, że ten kraj był wolny od krzywicy. Po kontaktach ze swoimi kolegami pełniącymi posłannictwo medyczne w różnych częściach świata uznał, że rozpowszechnienie krzywicy jest w odwrotnej zależności od stopnia ekspozycji ludności na promieniowanie słoneczne. Swoje obserwacje przedstawił w 1890 r. w artykule pt. „The geographic distribution and etiology of rickets” [15]. Były one zgodne z nieco wcześniejszym raportem British Medical Association na temat geograficznych uwarunkowań występowania chorób. Artykuł Palma nie znalazł szerszego oddźwięku, jednak w latach 1920-tych został on Prezesem Ligi Światła Słonecznego (The Sunlight League) łączącej kilka nurtów pierwszych organizacji ekologicznych.

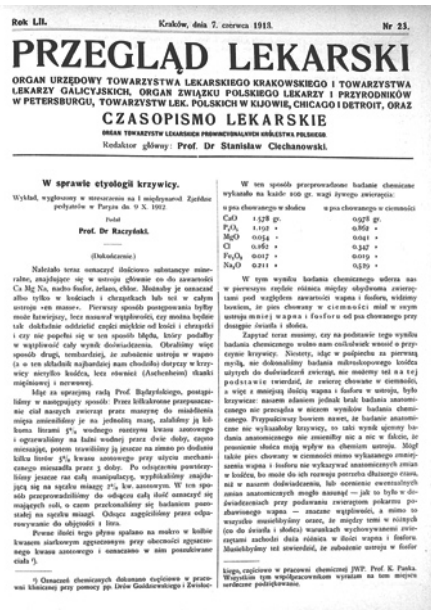
Wyniki badań doświadczalnych nad przyczynami krzywicy i znaczeniem promieniowania słonecznego dla zwierząt doświadczalnych zostały przedstawione na Pierwszym Kongresie Światowego Towarzystwa Pediatrycznego w Paryżu, w 1912 r. Autorem wykładu „Recherches expérimentales sur le manque d'action du soleil comme cause du rachitisme”, którego streszczenie zostało zamieszczone w materiałach Kongresu wydanych w 1913 r. [16] (Ilustracja 3), był Jan Raczynski (1865–1918), urodzony w Nowym Sączu i wykształcony w Krakowie profesor medycyny na Uniwersytecie Lwowskim.



Ilustracja 3. Książka abstraktów 1-szego Kongresu Międzynarodowego Stowarzyszenia Pediatrycznego w Paryżu, 1912 r., strona tytułowa

Illustration 3. Book of abstracts of the First Congress of the International Pediatric Association in Paris, 1912

Paryski wykład został rozwinięty w obszernym artykule w języku polskim zamieszczonym w *Przeglądzie Lekarskim* w 1913 r. [16, 17] (Ilustracja 4). Roczna statystyka kliniki chorób dzieci Uniwersytetu Lwowskiego wskazywała, że liczba odnotowanych przypadków krzywicy u dzieci (od 3 do 12 miesięcy) wzrasta w miesiącach wiosennych, osiąga maksimum w maju, a następnie obniża się do stanu minimalnego w październiku. Fakt sezonowego nasilenia występowania krzywicy odnotowano wcześniej w literaturze medycznej aczkolwiek, jak się wydaje, bez adekwatnego wyjaśnienia. Raczyński podjął przypuszczenie, że to brak słońca jest przyczyną krzywicy u znacznej części dzieci urodzonych w miesiącach późnojesiennych i zimowych.



Ilustracja 4. *Przegląd Lekarski*, 1913 r., strona tytułowa artykułu J. Racyńskiego „Etiologia krzywicy” (drugiej części)

Illustration 4. *Przegląd Lekarski*, 1913 r., the title page of the article of J. Racyński ‘Etiology of rickets’ (the second part)

Wykonał on następujące doświadczenie: Dwa szczenięta z tego samego miotu o podobnej masie hodowano jedno „w ogrodzie, gdzie prawie od wschodu do zachodu słońce przebywało”, a drugie w cieniu, w przewiewnym miejscu, obydwa karmione wyłącznie przez matkę. Po 6 tygodniach zwierzęta stracono i ilościowo oznaczono zawartość substancji mineralnych. Okazało się, że na 100 g masy psa hodowanego w słońcu przypada m.in. 1,578 g CaO oraz 1,192 g P₂O₅, a tego w cieniu (o większej całkowitej masie) – 0,978 g i 0,862 g, odpowiednio. Można odnotować, że w praktycznej stronie doświadczeń korzystano z rad Stanisława Bądryńskiego, profesora najpierw higieny, a później chemii lekarskiej tego samego uniwersytetu.

Oto trzy krótkie fragmenty, które odzwierciedlają poglądy autora:

„Wiemy już dzisiaj, że przyczyna niewapnienia kości nie leży ani w braku wapnia w pożywieniu, ani w zmniejszonym wchłanianiu wapnia z przewodu pokarmowego, tylko najprawdopodobniej polega ona na utracie zdolności osadzania wapnia krążącego we krwi przez nowowytworzoną tkankę kostną.” (str. 328)

„Wynik chemiczny naszego, jakkolwiek tylko jednego doświadczenia, daje nam podstawę do wypowiedzenia zapatrywania, że brak działania słońca na ustrój wpływa ujemnie na osadzanie soli wapniowych i fosforanowych w kośćcu młodocianego ustroju, a gdy zubożenie ustroju w sole stanowi istotę krzywicy, możemy przyjąć, że brak wpływu słońca na ustrój jest przyczyną tej choroby.” (str. 342)

„Przypuścić tu można bezpośrednio działanie promieni słonecznych na nowowytworzoną tkankę kostną w ten sposób, że nabiera ona zdolności osadzania wapnia lub też, że ten wpływ słońca idzie drogą skomplikowanych procesów w przemianie materij, np. przez działanie na biologiczne własności krwi, mające niewątpliwie doniosłe znaczenie dla czynności komórek tkanki kostnej i chrząstki” (str. 342).

Jan Raczyński, wielce zasłużony dla pediatrii lwowskiej i polskiej, pozostał ściśle związany ze środowiskiem swoich studiów i początków praktyki lekarskiej i klinicznej. W zakończeniu poświęconej mu noty pośmiertnej w *Przeglądzie Lekarskim* [18] (pióra Stanisława Rogulskiego) czytamy:

„Miał szczególne umiłowanie i kult dla muzyki, której w wolnych chwilach się z przejęciem oddawał. Gościnny dom Jego, piastujący tradycję przyjaźni Wyspiańskiego, Malczewskiego, Żeleńskich, Rydla, Kasprowicza i wielu, wielu innych twórców parnasu polskiego, był przystanią dla intelektu i sztuk pięknych, a promieniując wysoką kulturą duchową, stanowił jakby miniaturę umysłowości Aten polskich – Krakowa.”

Odkrywcza praca Raczyńskiego, niestety, nie doczekała się odpowiadających jej znaczeniu cytowań w literaturze światowej, aczkolwiek jest znana polskiemu środowisku pediatrycznemu [19].

Odmienne podejście do badań nad krzywicą przyjął brytyjski lekarz, fizjolog i organizator służby zdrowia Edward Mellanby [20]. Powtarzalnie hodował on rachityczne szczenięta na diecie składającej się z płatków owsianych, ryżu lub chleba oraz odtłuszczonego mleka i oleju lnianego – produktów, które stanowiły podstawę żywienia ludności wysp brytyjskich. Wykazał następnie, że uzupełnienie takiego pokarmu niewielką ilością masła, łożu, oleju z wątroby dorsza (tranu), itp. zapobiega występowaniu choroby. Tran okazał się najbardziej skuteczny i na tej podstawie został zalecony jako przeciwkrzywiczny dodatek do diety dzieci. Należy odnotować, że w pracach tego badacza czynnik światła został całkowicie pominięty (zwierzęta prawdopodobnie nie były wystawiane na bezpośrednie promieniowanie słoneczne).

W okresie, gdy zostały opublikowane badania nad rachitycznymi szczeniakami (1919 r.) szybko zyskiwała na znaczeniu koncepcja Kazimierza Funka (sformułowana w Londynie) o znaczeniu witamin w leczeniu chorób niezakaźnych, do których zaliczono m.in. krzywicę. Poznano witaminę B, która okazała się mieszaniną

różnych związków oraz przeciwskorbutową witaminę C (obydwie rozpuszczalne w wodzie). Praca Mellanby wyśmienicie mieściła się w tym nowym nurcie badań fizjologicznych, a dotyczyła witamin rozpuszczalnych w tłuszczach.

Skuteczność promieniowania w leczeniu krzywicy jednoznacznie wykazał niemiecki lekarz Kurt Huldshinsky [21]. Dysponował on narzędziami jakich nie mieli jego poprzednicy (żadnego z nich zresztą nie cytował), wysokociśnieniową lampą rtęciową do generowania promieniowania ultrafioletowego oraz aparatem Röntgena do śledzenia zmian kości.

W 1922 r. ukazało się drukiem sprawozdanie ze skrupulatnych, kilkuletnich badań nad krzywicą prowadzonych przez ekipę brytyjskiego Medical Research Council w Klinice Dziecięcej Uniwersytetu w Wiedniu „The aetiology of rickets in infants: prophylactic and curative observations at the Vienna University Kinderklinik” [22]. Badania kliniczne dowiodły, że naświetlanie promieniami ultrafioletowymi oraz tran, każdy z tych środków niezależnie od siebie, mają działanie zapobiegawcze i lecznicze.

3. TROPEM ŚWIATŁA

Wyjaśnienie charakteru działania czynnika pokarmowego i naświetlania było nie lada wyzwaniem. Szczególnie tajemniczy wydawał się czynnik naświetlania nie mający odpowiednika w leczeniu innych schorzeń. Część autorów badań w Wiedeńskiej Klinice Dziecięcej podjęła „wątek klimatyczny”. Odnosi się on do przekonania, że powietrze w pewnych szczególnych miejscowościach ma działanie regenerujące i uzdrawiające. Może to właśnie jakiś składnik powietrza pośredniczy w działaniu promieniowania na organizm zwierzęcia? (Wiedziano, że lampy rtęciowe wytwarzają ozon). Zaplanowano następujące doświadczenie [23, 24]. W dużym pojemniku umieszczono rachitycznego szczura wyhodowanego na diecie pozbawionej rozpuszczalnych w tłuszczach witamin i poddano go naświetlaniu lampą rtęciową. Po zakończeniu naświetlania do pojemnika wstawiono drugiego takiego samego szczura. Po pewnym czasie stwierdzono, że objawy wyleczenia wykazywały w równym stopniu obydwie zwierzęta, i to napromieniowane i to dostawione. Wykonano wiele innych doświadczeń, łącznie z przepompowaniem powietrza z jednego pojemnika do drugiego i uznano, że naświetlone powietrze ma właściwości lecznicze. Ostatecznie okazało się, nie wnikając zbyt w szczegóły eksperymentalne i zwyczajnie szczurów, że dostawiony osobnik uzyskiwał czynnik przeciwrachityczny nie z powietrza, a drogą pokarmową. Pozytywną stroną tego obarczonego błędem doświadczenia [25, 26] było wskazanie na wyleczenie zwierzęcia, które nie było bezpośrednio naświetlane.

Szczur był bardzo trudnym zwierzęciem doświadczalnym do badań nad rozpuszczalnymi w tłuszczach witaminami, zwłaszcza nad witaminą D, ze względu na przystosowanie do życia w ciemności. Odpowiednie rachityczne odmiany tego zwierzęcia, diety pozbawione określonych składników pokarmowych i klatki

zapewniające usuwanie nieczystości zostały opracowane przez Elmera V. McColluma i współpracowników (The University Wisconsin, Madison, a następnie John Hopkins University, Baltimore). Ci badacze zdołali opracować cały zestaw metod pozwalających na „biologiczną analizę” żywności. McCollum był jednym z odkrywców witaminy A (m.in. czynnik wzrostu), będącej składnikiem mieszaniny rozpuszczalnych w tłuszczach witamin. Struktura tego związku nie była wówczas znana, lecz poznano pewne jego właściwości chemiczne, a w szczególności to, że w wyższej temperaturze ulega utlenieniu tlenem powietrza i deaktywacji. McCollum wykazał, że tran nie traci właściwości przeciwrachitycznych w takim procesie napowietrzania, a zatem że czynnością tą obdarzony jest inny czynnik, który został nazwany witaminą D [27, 28].

Golblatt i Soames [29] podjęli kwestię przeniesienia efektu naświetlania promieniami ultrafioletowymi z jednego zwierzęcia wyhodowanego na diecie bezwitaminowej na drugie. W szczególności badali czy, i jeżeli tak to gdzie, akumuluje się „witamina”. Stwierdzili oni, że wątroba rachitycznego szczura poddanego cyklowi naświetlań promieniami UV, zawiera znaczące ilości witaminy. Dodanie tej tkanki do karmy innego rachitycznego zwierzęcia powodowało jego wyleczenie.

Obserwacje o tym, że naświetlanie promieniami ultrafioletowymi rozmaitych produktów żywieniowych może zastąpić naświetlanie rachitycznych zwierząt opublikowali niemal w tym samym czasie, niezależnie od siebie, dwaj fizjologowie amerykańscy, Harry Steenbock i Alfred F. Hess (wspomniany już wyżej w kontekście traktatu Śniadeckiego). Dalsze drogi badawcze tych wybitnych uczonych jednak się rozeszły.

Steenbock przeszedł wszystkie szczeble kariery naukowej na Wydziale Chemii Rolniczej Uniwersytetu Madison, Wisconsin, który specjalizował się w biochemii i fizjologii żywienia i tradycyjnie podejmował zagadnienia ważne dla miejscowego przemysłu spożywczego. Wskutek rozpowszechnienia taniej margaryny, wynalezionej w Europie i produkowanej w latach I wojny światowej, pozycja masła, podstawowego produktu mleczarstwa Wisconsin, została zagrożona. Steenbock badał właściwości żywieniowe masła, a także możliwości polepszenia margaryny przez dodanie witaminy A (obecnej w masle) i, ewentualnie, innych dodatków uszlachetniających. Odkrył on, że naświetlanie promieniami ultrafioletowymi racji żywnościowych zwierząt zapobiega krzywicy. W pierwszym komunikacie Steenbock zapowiedział, że jego wynalazek zostanie opatentowany [30, 31]. Rzeczywiście uzyskał szereg patentów, co więcej w 1925 r. stworzył organizację, której zadaniem było administrowanie patentami i ochrona interesów ich właściciela, Uniwersytetu w Madison. Organizacja ta – The Wisconsin Alumni Research Foundation – do dziś jest wzorcową instytucją pośredniczącą pomiędzy uczelnią a przemysłem. Według monografii Fieserów [32], do roku 1945, gdy okres ochronny głównego patentu wygasł, Fundacja zgromadziła tytułem tantiem około 14 mln dolarów amerykańskich (ówczesnych!).

W latach 20. ubiegłego stulecia istniało wiele kontrowersji wokół patentowania niektórych odkryć naukowych ze względu na rysujący się konflikt pomiędzy

interesami wynalazcy i ewentualnego producenta, a tzw. dobrem wspólnym. Żadna z odkrytych wówczas witamin nie została opatentowana. Konflikt ten w pewnym stopniu znajduje odbicie w dzisiejszych dyskusjach na temat praw autorskich i tzw. ustaw ACTA (ang. *Anti-Counterfeiting Trade Agreement*). W charakterze dygresji można wspomnieć, że 1 α ,25-dihydroksy witamina D₃ została opatentowana jako związek przez tę właśnie Wisconsin Alumni Research Foundation. Znaczy to, że gdybym chciał syntetyzować 1 α ,25-dihydroksy witaminę D₃ na potrzeby własnego organizmu z cholesterolu wyodrębnionego z własnych kamieni żółciowych i posługując się własną metodą, musiałbym uiścić opłatę właścicielowi patentu. Drugą stroną tego paradoksu jest dość powszechne dziś przekonanie, że w epoce globalizacji technologii ochronę produkcji mogą zapewnić tylko patenty na konkretne związki chemiczne.

Hess ukończył wykształcenie w Uniwersytetach Columbia i Harvarda, a następnie w College of Physicians and Surgeon of New York City. Po studiach odbył dwuletni staż naukowy w Europie: Pradze, Wiedniu i Berlinie. Był on praktykującym lekarzem-pediatrą zaangażowanym w leczenie krzywicy i badaczem związanym z College of Physicians and Surgeones i University of Columbia. Powtórzył on wyżej opisane doświadczenie z naświetlaniem lampą ultrafioletową powietrza, a także poddał naświetlaniu wodę i „szereg neutralnych” płynów m.in. oleje bawełniane i lniane, lanolinę, rosnącą i zerwaną zieloną sałatę. Stwierdził, że to oleje nabywają szczególnie wysokiej aktywności [33].

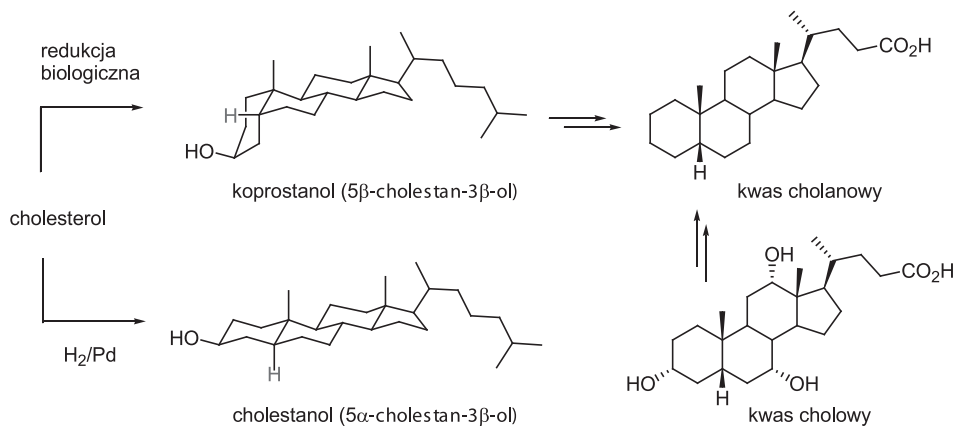
Poszukiwania właściwego czynnika antyrachitycznego doprowadziły Hessa i jego współpracowników do niehydrolizujących i nierozpuszczalnych w wodzie składników olei roślinnych, czyli do steroli roślinnych zwanych wówczas fitosterolami (sitosterole), a stąd i do cholesterolu. Sukces tego zespołu polegał na sprowadzeniu aktywności biologicznej do zdefiniowanych substancji chemicznych i do powiązania tej czynności z cholesterolem obecnym w dużej ilości w wewnętrznych warstwach skóry. Jednakże rozpoznanie istoty przemiany fotochemicznych steroli przekraczało możliwości lekarzy i fizjologów. W 1925 r. Hess zwrócił się o pomoc w znalezieniu leku przeciw krzywicy do autorytetu w dziedzinie steroli, niemieckiego chemika Adolfa Windausa.

4. ŻŁOTY WIEK CHEMII

Windaus studiował medycynę i chemię w Berlinie, a następnie w Freiburgu. Jego praca doktorska wykonana pod kierownictwem Kilianiego poświęcona była glikozydom nasercowym z roślin rodzaju naporstnica (*Digitalis*). Pracę habilitacyjną pt. „Über cholesterin” obronił w 1903 r. i dalszą działalność naukową, od 1915 r. jako profesor w Getyndze, poświęcił głównie sterolom i związkom pokrewnym.

Na przełomie XIX i XX wieku oprócz cholesterolu i ergosterolu znano jeszcze sitosterole (często zawierają niewielkie ilości ergosterolu) i kilka innych steroli. Wiedząno, że zawierają one w szkielecie węglowym od 27 do 29 atomów węgla (odpo-

wiednie węglowodory $C_{27}H_{48}$ i $C_{29}H_{52}$) są alkoholami (ferolami) o jednym, dwu lub trzech wiązaniach etylenowych i o strukturze tetracyklicznej. Kluczową pozycję ze względu na rozpowszechnienie i częściowo poznane funkcje fizjologiczne zajmował cholesterol.



Schemat 2. Biologiczna (w przewodzie pokarmowym) i chemiczna redukcja cholesterolu
 Scheme 2. Biological (in digestion track) and chemical reduction of cholesterol

Cholesterol w przewodzie pokarmowym zwierząt ulega redukcji prowadzącej do dihydro-pochodnej, koprostanolu (Schemat 2). Ten proces redukcji biologicznej cholesterolu oraz koprostanol pierwszy opisał wspomniany już lwowski lekarz i chemik Stanisław Bądryński [34]. Wodorowanie na katalizatorze palladowym (opisane wcześniej przez Willstättera) prowadziło do innego związku nasyconego – cholestanolu. Windaus prawidłowo rozpoznał, że koprostanol i cholestanol to izomery różniące się konfiguracją na zwornikowym atomie węgla, aczkolwiek nie było wówczas odniesienia do jakichkolwiek innych nasyconych związków bicyklicznych.

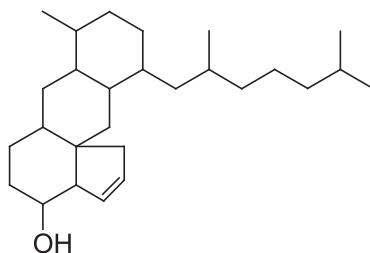
Przestrzenne struktury koprostanolu i cholestanolu zobrazowano na Schemacie 2. Związki te różnią się kształtem ze względu na obecność fragmentu „wypukłej” *cis*- i „płaskiej” *trans*-dekaliny. Należy odnotować, że cząsteczki cholesterolu i ergosterolu są zbliżone do cholestanolu (płaskie).

Fundamentalne znaczenie miała przeprowadzona w laboratorium Windausa korelacja koprostanolu (a zatem i cholesterolu) z kwasami cholowymi: grupę hydroksylową w koprostanolu usunięto, a następnie węglowódz poddano utlenieniu otrzymując kwas cholany (produktem komplementarnym był aceton). Identyfikację związku otrzymano w laboratorium innego wielkiego chemika niemieckiego, Heinricha Wielanda w drodze transformacji kwasu cholowego, głównego składnika żółci bydłowej.

Dalsze badania nad strukturą cholesterolu były prowadzone równolegle na dwóch frontach, poprzez degradację steroli (Windaus) oraz kwasów żółciowych (Wieland). Otrzymano i zidentyfikowano bardzo wiele produktów utleniania, które

identyfikowano dostępnymi wówczas metodami, głównie przez tworzenie pochodnych i niezależną syntezę. Ustalenie budowy tych bloków i „powtórne” zestawienie struktury związków wyjściowych było pracą tytaniczną i benedyktyńską.

W 1919 r. Windaus [35] na posiedzeniu Towarzystwa Naukowego w Getyndze naszkicował pierwszy wzór strukturalny cholesterolu (Rys. 3). Kontynuowano intensywne prace nad weryfikacją tego wzoru i odpowiednich wzorów kwasów cholowych. Ergosterol pozostawał jednak poza zasięgiem badań w laboratorium Windausa po części ze względu na bardziej złożony charakter transformacji chemicznych (układ dienowy).



Cholesterol, wzor Windausa, 1919 r.

Rysunek 3. Wzór cholesterolu zaproponowany przez Windausa w 1919 r.
Figure 3. Structural formula of cholesterol proposed by Windaus in 1919.

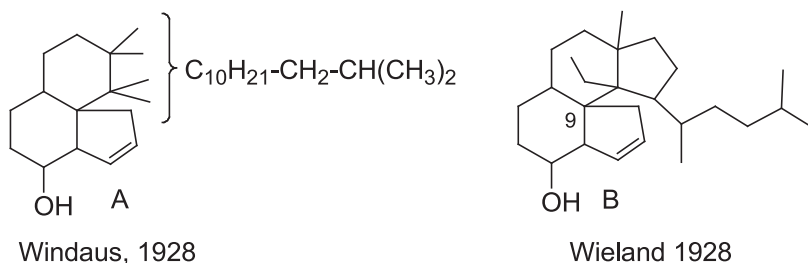
Podając poszukiwania czynnika antykrzywiczego Windaus wspólnie z Hessem wykazali, że czynność obserwowana podczas naświetlania próbek cholesterolu pochodzi nie od tego związku lecz od jego drobnego zanieczyszczenia, nieusuwalnego podczas krystalizacji. Zanieczyszczenie to Windaus nazwał prowitaminą D. Do podobnych wniosków doszli i chemicy brytyjscy, Rosenheim i Webster z the National Institute for Medical Research (NIMR) w Londynie. Z dzisiejszej perspektywy możemy uznać, że tą prowitaminą był 7-dehydrocholesterol (prowitamina D₃) [36–38].

W kontekście poszukiwania zanieczyszczenia cholesterolu fizyk z Getyngi, Pohl [39], i prawie jednocześnie z nim Heilbron i współpracownicy [40] (The Liverpool University, później The Imperial College of Science and Technology, Londyn) zastosowali widma w ultrafiolecie. Było to pierwsze w historii zastosowanie spektroskopii do określania struktury związków organicznych. Widma zdejmowano w świetle ultrafioletowym w specjalnie skonstruowanym w tym celu spektrometrze. Oczyszczony cholesterol był transparentny, natomiast jego zanieczyszczenia charakteryzowały pasma absorpcji przy 293, 280 i 269 nm (nieco później wykryto czwarte pasmo absorpcji przy 262 nm). Podobne pasma zarysowały się również w pomiarach roztworu tranu. Warto wspomnieć, że w Liverpool do jednego pomiaru stosowano roztwór 2 g cholesterolu w 50 ml etanolu w kuwecie o szerokości 4 cm, a sam pomiar trwał kilka godzin, wprawdzie długo ale niewspółmiernie krócej od testów biologicznych.

Ergosterol jako jedyny wśród znanych wówczas steroli wykazywał analogiczne pasma absorpcji w ultrafiolecie. Rzeczywiście, naświetlanie ergosterolu w Getyndze [41], jak również w NIMR [42], prowadziło do mieszaniny związków o niespotykanym wcześniej działaniu przeciwrzywiczym (100 000 razy wyższym od dobrego tranu). Względna aktywność produktów otrzymanych z naświetlania cholesterolu i ergosterolu oceniano jak 1:2000.

W Getyndze skonstruowano aparaty i rozwiązano podstawowe problemy techniczne prowadzenia procesu fotolizy. W końcu lat 20. w zasadzie można było uznać, że stworzono należyte podstawy do produkcji „witaminy przeciwrzywicznej”, chociaż ani nie wyodrębniono czystego związku, ani nie odgadnięto jego struktury. Wszystkie znaki wskazywały na to, że klucz do rozszyfrowania struktury witaminy D leży w strukturze cholesterolu.

W 1928 r. w Sztokholmie zostały wręczone dwie nagrody Nobla w dziedzinie chemii. Laureatami byli Heinrich Wieland (wstecznie za 1927 r.) „for his investigation of the constitution of the bile acids and related substances” oraz Adolf Windaus „for the services rendered through his research into the constitution of the sterols and their connection with the vitamins”. Obydwaj ci uczeni w wykładach noblowskich przedstawili w zasadzie zgodne struktury cholesterolu (Rys. 4, A i B). Struktura Windausa (A) była nieco bardziej konserwatywna od struktury Wielanda (B) pozostawiająca nieokreśloność w obszarze „czwartego” pierścienia i pozycji zakotwiczenia łańcucha bocznego. Natomiast Wieland przedstawił jeszcze jedną strukturę alternatywną do B (nie uwzględnioną na Rys. 4), co można uznać za wskazanie, że nie uznawał tej kwestii za zamkniętą. Struktura B jest często nazywana strukturą Wielanda-Windausa.



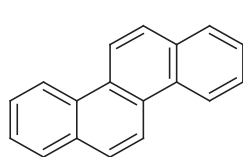
Rysunek 4. Wzory cholesterolu przedstawione na wykładach w 1928 r. z okazji przyznania Nagród Nobla H. Wielandowi i A. Windausowi

Figure 4. Structural formulas of cholesterol presented in 1928 by H. Wieland and A. Windaus at the Nobel Price lectures

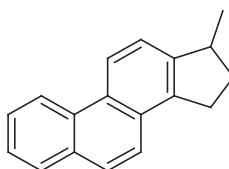
W 1927 r. pojawił się nowy wątek w publikacjach dotyczących steroli. Mianowicie, Otto Diels [43], wraz ze współpracownikami opublikował wyniki pierwszych doświadczeń nad ich dehydrogenacją. Diels miał już znaczne osiągnięcia we wczesnych pracach nad strukturą cholesterolu, lecz od tej tematyki odstąpił na kilkanaście lat. Teraz zastosował metodę wprowadzoną i szeroko stosowaną przez

Leopolda Ruzickę – konwersję terpenoidów do ich odpowiedników aromatycznych w celu „odsłonięcia” szkieletu węglowego, łatwiejszej identyfikacji, łączenia w klasy, itp. [44]. Dehydrogenację prowadzono stosując w podwyższonej temperaturze (zwykle w temperaturze wrzenia) elementarną siarkę lub pallad osadzony na węglu aktywnym.

Ogrzewanie cholesterolu z „palladowanym” węglem w temperaturze ok. 400°C doprowadziło z dobrą wydajnością do krystalicznego i łatwego do rozpoznania węglowodoru aromatycznego – chryzenu (Rys. 5). (Część tych badań została zreferowana przez Dielsa w wykładzie z okazji przyznania mu Nagrody Nobla w 1950 r. „Description and importance of the aromatic basic skeleton of the steroids”). Wyników nie uznano jednak za konkluzywne ze względu na wysoką temperaturę procesu i szczególną trwałość termodynamiczną chryzenu, co mogło powodować przegrupowania szkieletowe. W dalszych poszukiwaniach Diels odkrył, że znacznie lepszym środkiem dehydrogenującym jest elementarny selen. Ogrzewanie cholesterolu z selenem w umiarkowanej temperaturze (około 250°C) prowadziło do innego produktu, który uzyskał nazwę węglowodoru Dielsa. Minęło jeszcze kilka lat zanim strukturę tego węglowodoru potwierdzono na drodze niezależnej syntezy [45, 46] (Rys. 5). Tym niemniej, wszystkie dane wskazywały na to, że jest to pochodna cyklopentanofenantrenu. Doświadczenia Dielsa rzuciły cień wątpliwości na wzór Wielanda-Windausa.



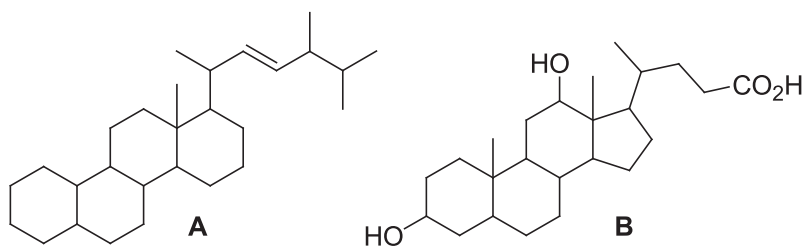
Chryzen

Węglowódor Dielsa
(3'-metylo-1,2-cyklopentanofenantren)

Rysunek 5. Produkty dehydrogenacji cholesterolu otrzymane przez Dielsa
Figure 5. Cholesterol dehydrogenation products obtained by Diels

Brytyjski fizyko-chemik, teoretyk i krystalograf, Bernal, badał kryształy ergosterolu i pewnych produktów jego naświetlania. Zagadnienie struktury steroli nie było mu całkiem obce, gdyż od lat 20. wraz ze współpracownicą, Dorothy Crowfoot-Hodgkins (późniejszą laureatką Nagrody Nobla), podejmował próby identyfikacji ich metabolitów wyodrębnionych z moczu (przez Marriana i współpracowników w Londynie). Technika analizy rentgenograficznej nie pozwalała jeszcze na umiejscowienie poszczególnych atomów szkieletu węglowego, lecz tylko na ogólne określenie kształtu cząsteczki. Bernal zaobserwował, że cząsteczki ergosterolu w kryształach układają się w podwójne warstwy podobnie jak to ma miejsce w przypadku długołańcuchowych alifatycznych alkoholi. Rozmiary cząsteczki nie pokrywały się z oczekiwanymi. Głównym źródłem kontrowersji było to, że pomiar wskazywał na

wydłużoną płaską cząsteczkę wówczas, gdy wzór Wielanda-Windausa implikuje przestrzennie rozbudowaną bryłę ze względu na obecność jednego atomu węgla wspólnego dla trzech pierścieni (C-9 na Rys. 4). Wyniki pomiaru oraz doniesienia z laboratorium Dielsa skłoniły Bernala do zaproponowania dla steroli (ściślej, dla ergosterolu) nowego wzoru, opartego na szkielecie węglowym perhydrochryzenu [47–49] (Rys. 6). Równocześnie z komunikatem Bernala ukazała się bardzo podobna propozycja Rosenheima i Kinga [50].



Bernal, Rosenheim i King,
maj, 1932

Rosenheim i King,
sierpień, 1932

Rysunek 6. Ramowy wzór steroli zaproponowany przez Bernala oraz Rosenheima i Kinga (A), wzór kwasu dezoksycholowego zaproponowany przez Rosenheima i Kinga (B)

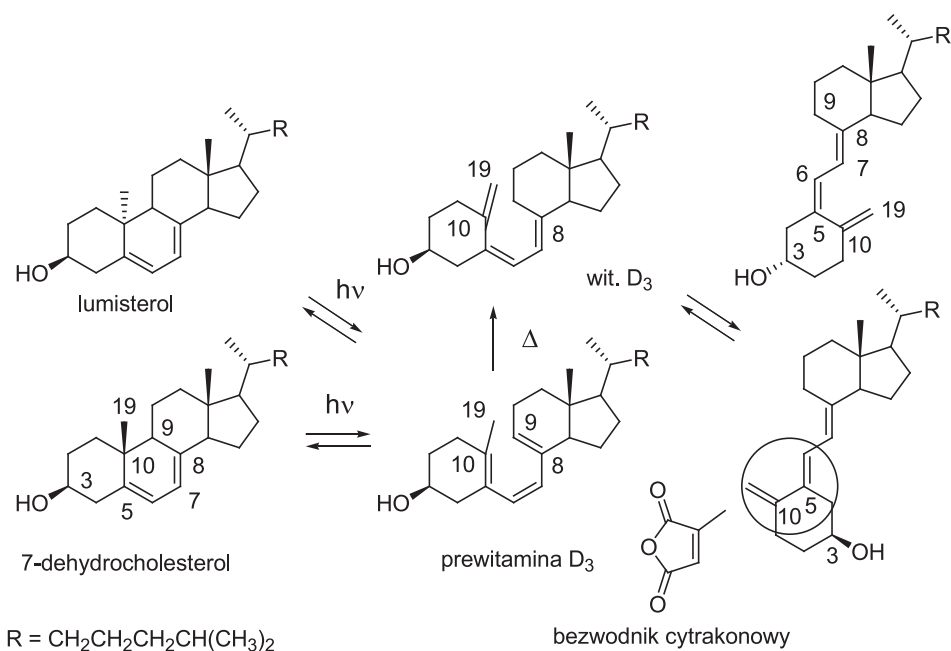
Figure 6. Framework structure of sterols proposed by Bernal and Rosenheim, and King (A), formula of desoxycholic acid proposed by Rosenheim, and King

Ci ostatni autorzy po pogłębionych studiach literaturowych jako pierwsi opublikowali prawidłowy, obecnie powszechnie znany, wzór kwasu dezoksycholowego [51] (Rys. 6). W ten sposób badacze, którzy nie angażowali się w mozolne doświadczenia nad degradacją i chemicznymi przekształceniami steroli i kwasów żółciowych i sami nie opublikowali ani jednej pracy w tej dziedzinie jako pierwsi wydedukowali jakie wzory należy przypisać tym związkom. Nieco później na podstawie powtórnej analizy własnych danych eksperymentalnych do takiego samego wzoru dotarli również Wieland i Dane [52]. Ostatecznie Windaus [53] w obszernej publikacji pt. „Über Konstitution des Cholesterins und der Gallensäuren” podsumował całokształt prac nad tymi grupami związków.

W międzyczasie intensywnie postępowaly prace nad optymalizacją warunków naświetlania ergosterolu i wyodrębnieniem przeciwkrzywiczej witaminy [54]. Chemicy z NIMR oczyszczali produkt poprzez destylację frakcyjną. Uzyskali oni na tej drodze wysoce aktywną substancję krystaliczną, którą nazwali kalcyferolem [55] (ergokalcyferol). Windaus i współpracownicy wyizolowali materiał krystaliczny, który nazwali witaminą D₁ [56]. Okazało się jednak, że jest to współkryształizująca mieszanina witaminy oraz jednego z ubocznych produktów fotolizy (lumisterolu). Po wielu próbach, w których stosowano lampy do generowania promieniowania o różnym zakresie i różne metody izolacji, otrzymano czystą witaminę D₂ (ergokalcyferol). Ważne w tej metodzie postępowania było to, że fotolizę prowadzono do

zużycia około 60% ergosterolu, a niezmieniony substrat oddzielono (w postaci kompleksu z digitoniną). Oleistą mieszaninę produktów poddano działaniu bezwodnika cytrakonowego w temperaturze pokojowej (10 dni) i, kolejno, hydrolizie i odmyciu soli kwasu. Dopiero tak przygotowany produkt krystalizował z eteru naftowego [57].

Mimo sukcesów w dziedzinie izolacji struktura witaminy D₂ nadal pozostawała zagadką, a korelacja ergosterolu z cholesterolem została opublikowana dopiero rok później [58]. Aby zrozumieć istotę procesów chemicznych w procesie izolacji produktu krystalicznego musimy przedzielić rozwój wypadków.



Schemat 3. Fotochemiczne przemiany 7-dehydrocholesterolu

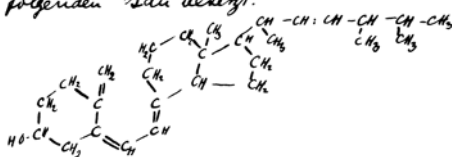
Scheme 3. Photochemical transformations of 7-dehydrocholesterol

W latach 50. Vielluz i współpracownicy [59, 60] wykazali, że naświetlanie ergosterolu jak również 7-dehydrocholesterolu powoduje rozerwanie wiązania C-9,C-10 i utworzenie trienu, „prewitaminy” (Schemat 3). Jest to fotochemiczna reakcja odwracalna i prowadzi również do utworzenia izomeru substratu, lumisterolu. Prewitamina ulega termicznemu przegrupowaniu przebiegającemu z przeniesieniem atomu wodoru od grupy metylowej C-19 do C-9. (W poprzednich badaniach naświetlanie prowadzono w wyższych temperaturach i obydwa procesy, fotochemiczny i termiczny, przebiegały równolegle). W warunkach transformacji, część produktu ulega izomeryzacji *cis-trans* wokół wiązania C-5,C-6 dając „trans-witaminę D₂”. Obydwa związki, *cis* i *trans*, mają aktywny układ dienu obejmującego pierścień sześciocząłowy (atomy węgla C-5, C-6, C-10, C-19). Dien „*trans*” jest

mniej osłaniany przestrzennie i łatwiej ulega reakcji Dielsa-Aldera z bezwodnikiem cytrakonowym (lub maleinowym). Hydroliza adduktu do odpowiedniego kwasu dikarbosylogowego pozwala na usunięcie niepożądanego produktu. Należy wspomnieć, że według badań Havingi i współpracowników [61] fotochemiczna reakcja, w zależności od długości fali, okresu naświetlania, itp., prowadzi do utworzenia bardzo wielu produktów, a przy dłuższym naświetlaniu prewitamina, witamina i inne trieny ulegają dalszym reakcjom fotochemicznym aż do utworzenia produktów pozbawionych chromoforu.

W 1936 r. została opublikowana prawidłowa struktura witaminy D₂ [62]. Przypisanie miało czysto spekulatywny charakter, gdyż nie dysponowano żadnymi dowodami potwierdzającymi utworzenie egzocyklicznej grupy metylenowej (można było racjonalnie oczekiwać, że fotolitycznemu rozerwaniu ulegnie najbardziej „obciążone” wiązanie C-9–C-10). Ciekawe odnotować, że przed publikacją struktury Windaus zasięgnął opinii Bernala. Kopia listu w tej sprawie została zamieszczona we wspomnieniach Hodgkin [49] i jest przytoczona na Ilustracji 5. Według tych wspomnień, Bernal wzoru nie poparł, lecz też nie miał podstaw aby oponować. Nieco wcześniej konkurencyjny, jak się okazało błędny, wzór witaminy D₂ zaproponował Heilbron [63].

*John geachtster Heil kollega Bernal,
ich glaube es ausserordentlich wahrscheinlich gemacht
zu haben, dass das Vitamin D₂ oder Calciferol
den folgenden Bau besitzt:*



*Ich möchte Sie nun fragen, ob eine solche Formel, die
sich aus unseren chemischen Arbeiten zu ergeben scheint,
mit Ihren Messungen vereinbar ist.*

Mit den besten Grüßen

Dr. A. Windaus

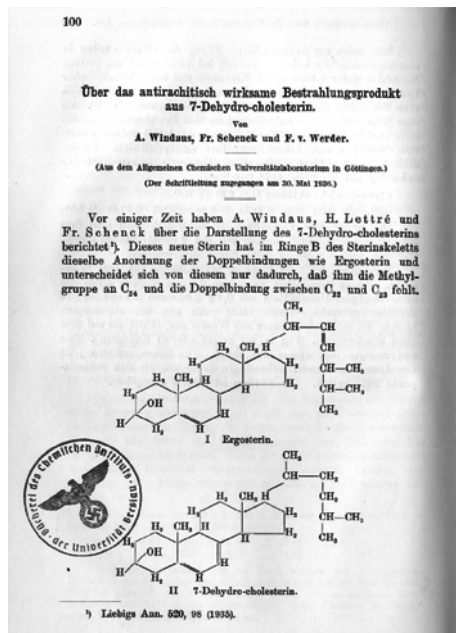
Ilustracja 5. Kopia listu Windausa do Bernala dotyczącego proponowanej struktury witaminy D₂. Skopiowano z: D.M.C. Hodgkin „John Desmond Bernal. 10 May 1901–15 September 1971”, Biogr. Mem. Fell. R. Soc., 1980, 26, 16–84, s. 40, za zgodą the Royal Chemical Society

Illustration 5. A copy of the letter of Windaus to Bernal regarding the proposed structure of vitamin D₂. Copied from: D.M.C. Hodgkin “John Desmond Bernal. 10 May 1901–15 September 1971”, Biogr. Mem. Fell. R. Soc., 1980, 26, 16–84, p. 40, with the permission of the Royal Chemical Society

Amerykański biochemik Waddell [64] podsumował często sprzeczne prace nad porównaniem substancji przeciwkrzywiczej wytwarzanej ze „standardowego” cholesterolu oraz z ergosterolu, a także nad działaniem tych produktów na różne

zwierzęta doświadczalne. Wykonane przez niego testy na kurczętach wykazały, że „witamina” przygotowana przez naświetlanie cholesterolu, a także tran, jest znacznie bardziej aktywna niż ta przygotowana przez naświetlanie ergosterolu.

W poszukiwaniu odpowiednika ergosterolu chemicy z Getyngi syntetyzowali z cholesterolu 7-dehydrocholesterol [65]. Naświetlanie tego związku i izolacja biologicznie czynnego produktu doprowadziły do otrzymania witaminy D₃ – związku wytwarzanego w organizmach zwierząt na drodze biosyntezy [66]. Pierwsza strona tej ważnej publikacji została skopiowana na Ilustracji 6.



Ilustracja 6. Kopia strony tytułowej pracy Windausa i współautorów dotyczącej otrzymywania witaminy D₃
Illustration 6. A copy of the first page of the publication of Windaus and coauthors on the synthesis of vitamin D₃

Niemal równocześnie, Brockmann [67], również w Getyndze, wyizolował identyczny związek ze oleju wątroby tuńczyka. Główną trudnością w dość złożonej procedurze izolacji witaminy D₃ z materiału biologicznego było oddzielenie witaminy A oraz cholesterolu (i 7-dehydrocholesterolu). Wielce pomocną okazała się nowa, jeszcze raczkująca metoda separacji związków organicznych – chromatografia kolumnowa na tlenku glinu, wcześniej stosowana tylko do rozdzielania substancji barwnych.

Obydwa związki, witaminy D₂ i D₃ charakteryzowały podobne właściwości fizyczne, m. in. silna absorpcja w ultrafiolecie (265 mμ), i zbliżona aktywność w testach na szczurach. Jednakże, w testach na kurczakach witamina D₂ wykazała mniej niż 3% aktywności witaminy D₃.

Badaniom poddano jeszcze jedną tkankę zwierzęcą – świeżą skórę wieprzową. Ze 100 kg tego materiału wyizolowano 30 g surowych steroli. Stosując chromatografię kolumnową wykazano, że głównym składnikiem jest cholesterol lecz zdołano także wyodrębnić 7-dehydrocholesterol – naturalną prowitaminę D₃ (4% surowej mieszaniny steroli) [68].

Dla kompletności obrazu należy jeszcze odnotować związek nazwany w laboratorium Windausa witaminą D₄ [69]. Jest to syntetycznie otrzymany 22-dihydroanalog witaminy D₂ wykazujący niższą aktywność przeciwkrzywiczą od związku macierzystego (około 50% u szczura) i jak dotąd używany tylko jako związek modelowy.

Struktura witamin D została ostatecznie potwierdzona w badaniach krystalograficznych Crowfoot i Dunitza [70] w 1948 r (pomiarów wykonano dla 4-jodo-5-nitrobenzoesanu witaminy D₂).

Badania nad strukturą steroli i witaminami D w laboratorium w Getyndze znalazły odzwierciedlenie w ponad 50 rozprawach doktorskich. Wielu ich autorów kontynuowało badania na stanowiskach podoktorskich w Getyndze lub innych ośrodkach akademickich, lub przemysłowych. Wiele innych ośrodków naukowych uczestniczyło w programie badań inspirowanych i koordynowanych przez Windausa, aczkolwiek publikacje nie zawsze były firmowane jego nazwiskiem. Zespół z Getyngi otrzymywał wsparcie finansowe jak również pomoc techniczną w przygotowaniu surowców od kilku niemieckich firm farmaceutycznych.

5. TRUDNA HISTORIA

W literaturze wspomnieniowej, a zwłaszcza w opracowaniach dotyczących życia i działalności wybitnych chemików niemieckich, szczególne znaczenie ma wątek ich stosunku do wojny oraz do ideologii narodowego socjalizmu. Windaus zajmuje pozycję wyjątkową ze względu na niekonformistyczną postawę oraz przeciwstawianie się polityce reżymu przy pełnej formalnej lojalności obowiązującej wykładowcę państwowego uniwersytetu w Niemczech [71].

W przeciwieństwie do swoich licznych kolegów, m.in. Wielanda, w czasie I wojny światowej odmówił wzięcia udziału w zespole ekspertów pracujących w Kaiser-Wilhelm Gesellschaft nad bronią chemiczną (nieodzwoloną przez konwencje Haskie).

Po 1933 r., jako kierownik Instytutu Chemii Organicznej w Getyndze, sprzeciwił się nagonce jaką część studentów i doktorantów podjęła przeciw Neisserowi, doktorantowi pochodzenia żydowskiego oraz kilku „poplecznikom Żydów”. W liście do ministra napisał, że nie jest jego zamiarem przeciwstawianie się polityce władz, lecz ze względów etycznych nie może zgodzić się na agitację w Instytucie. List został zrozumiany jako zapowiedź jego rezygnacji ze stanowiska, a w rezultacie przywódcę młodych nazistów przeniesiono na inny uniwersytet, a Neisser z powodzeniem ukończył pracę doktorską i wyemigrował. Podobne deklaracje Windaus składał w kilku innych sprawach, m.in. wprost odmówił podpisania listu poparcia

do Hitlera, który w imieniu niemieckich laureatów Nagrody Nobla napisał Prezydent Niemieckiego Towarzystwa Chemicznego, ubiegał się o zezwolenie na wzięcie udziału w spotkaniu upamiętniającym Fritza Habera w 1935 r. [72].

Mój niezjący już przyjaciel, prof. Wolfgang Kreiser z Uniwersytetu w Dortmund, mówił, że pewnego razu wchodząc do pracy Windausa natknął się na grupę młodzieży w brunatnych koszulkach i ze swastykami na rękawach. Odwrócił się na pięcie i więcej się w Instytucie nie pokazał. Trudno powiedzieć czy tak było rzeczywiście, czy też jest to jedna z legend, które otaczały postać Adolfa Windausa w środowisku jego naukowych wnuków. Faktem jest, że w 1938 r. przestał on przychodzić do Instytutu (miał 62 lata) chociaż na emeryturę przeszedł dopiero w 1944 r.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] M.F. Holick, *J. Invest. Dermatol.*, 1981, **77**, 51.
- [2] H.F. DeLuca, [w:] *Metabolic Bone Disease in Children*, S. Castells, L. Finberg (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, 1990, pp. 1.
- [3] R. Vieth, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 2006, **92**, 26.
- [4] *Paediatr. Child Health*, 2007, **12**, 583.
- [5] D.E.M. Lawson, D.R. Fraser, E. Kodicek, H.R. Morris, D.H. Williams, *Nature*, 1971, **230**, 228.
- [6] H.F. DeLuca, M.F. Holick, H.K. Schnoes, T. Suda, R.J. Cousins, *Biochemistry*, 1971, **10**, 2799.
- [7] A.W. Norman, J.F. Myrtle, R.J. Miogett, H.G. Nowicki, V. Williams, G. Popjak, *Science*, 1971, **173**, 51.
- [8] M.F. Holick, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 2006, **92**, 49.
- [9] H.F. DeLuca, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2004, **80**, 1689S.
- [10] W. Kroszczyński, B. Morzycka, J.W. Morzycki, *Wiad. Chem.*, 2002, **56**, 794.
- [11] D. Gibbs, *J. R. Soc. Med.*, 1994, **87**, 729.
- [12] J. Śniadecki, *O fizycznym wychowaniu dzieci*, wydanie Akademii Wychowania Fizycznego im. Bronisława Czecha w Krakowie, Kraków, 2002 r., reprodukcja wydania Ossolineum, Wrocław, 1956 r.
- [13] W. Mozołowski, *Nature*, 1939, **143**, 121.
- [14] A.F. Hess, L.J. Unger, *J. Am. Med. Assoc.*, 1921, **77**, 39.
- [15] T.A. Palm, *Practitioner*, 1890, **45**, 270.
- [16] J. Raczyński, *Comptes-Rendus de L'Association Internationale de Pediatrie, Premier Congress, 7-9 Octobre 1912*, 1912, 308.
- [17] J. Raczyński, *Przegląd Lekarski*, 1913, **52**, 327.
- [18] S. Rogulski, *Przegląd Lekarski*, 1919, **57**, 245.
- [19] J. Bodalski, *Przegląd Pediatryczny*, 2008, **38**, 175.
- [20] E. Mellanby, *The Lancet*, 1919, **193**, 407.
- [21] K. Huldschinsky, *Deutsch Med. Wochschr.*, 1919, **45**, 712.
- [22] H. Chick, E. Dalyell, M. Hume, H. Smith Henderson, H.M.M. Mackay, *The Lancet*, 1922, **200**, 7.
- [23] E.M. Hume, H. Henderson Smith, *Biochem. J.*, 1923, **17**, 364.
- [24] E.M. Hume, H. Henderson Smith, *Biochem. J.*, 1926, **20**, 336.
- [25] T.A. Webster, L. Hill, *Biochem. J.*, 1924, **18**, 340.
- [26] K.J. Carpenter, L. Zhao, *J. Nutr.*, 1999, **129**, 923.
- [27] E.V. McCollum, N. Simmonds, H.T. Parsons, P.G. Shipley, E.A. Park, *J. Biol. Chem.*, 1921, **45**, 333.

- [28] E.V. McCollum, N. Simmonds, J.E. Becker, P.G. Shipley, *J. Biol. Chem.*, 1922, **53**, 293.
- [29] H. Goldblatt, K.M. Soames, *Biochem. J.*, 1923, **17**, 446.
- [30] H. Steenbock, *Science*, 1924, **60**, 224.
- [31] H.A. Schneider, *J. Nutr.*, 1973, **103**, 1233.
- [32] L.F. Fieser, M. Fieser, *Steroids*, Reinhold, New York, 1959, s. 90.
- [33] A.F. Hess, M. Weinstock, *J. Biol. Chem.*, 1924, **62**, 301.
- [34] S. von Bondzynski, *Chem. Ber.*, 1896, **29**, 476.
- [35] A. Windaus, *Nachr. Ges. Wissensch. Göttingen, Math.-physik. Klasse*, 1919, 237.
- [36] A. Windaus, A. Hess, *Nachr. Ges. Wissensch. Göttingen, Math.-physik. Klasse*, 1926, 175.
- [37] A.F. Hess, A. Windaus, *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 1926, **24**, 1971.
- [38] O. Rosenheim, T.A. Webster, *Biochem. J.*, 1927, **21**, 127.
- [39] R. Pohl, *Nachr. Ges. Wissensch. Göttingen, Math.-physik. Klasse*, 1927, 185.
- [40] I.M. Heilbron, E.D. Kamm, R.A. Morton, *Biochem. J.*, 1927, **21**, 78.
- [41] A.F. Hess, A. Windaus, *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 1927, **24**, 461.
- [42] O. Rosenheim, T.A. Webster, *Biochem. J.*, 1927, **21**, 389.
- [43] O. Diels, W. Gädke, P. Körden, *Liebigs Ann. Chem.*, 1927, **459**, 1.
- [44] L. Ruzicka, M.W. Goldberg, G. Thomann, *Helv. Chim. Acta*, 1933, **16**, 812.
- [45] S.H. Harper, G.A.R. Kon, F.C.J. Ruzicka, *J. Chem. Soc.*, 1934.
- [46] O. Diels, H.F. Rickert, *Chem. Ber.*, 1935, **68**, 267.
- [47] J.D. Bernal, *Nature*, 1932, **129**, 277.
- [48] J.D. Bernal, *Chem. Ind.*, 1932, 466.
- [49] D.M.C. Hodgkin, *Biogr. Mem. Fell. R. Soc.*, 1980, **26**, 16.
- [50] O. Rosenheim, H. King, *Nature* 1932, **130**, 315.
- [51] O. Rosenheim, H. King, *Chem. Ind.*, 1932, 464.
- [52] H. Wieland, E. Dane, *Z. Physiol. Chem.*, 1932, **210**, 268.
- [53] A. Windaus, *Z. Physiol. Chem.*, 1932, **213**, 147.
- [54] A. Windaus, *Proc. R. Soc. Lond. B*, 1931, **108**, 568.
- [55] T.C. Angus, F.A. Askew, R.B. Bourdillon, H.M. Bruce, R.K. Callow, C. Fischmann, J.S.L. Philpot, T.A. Webster, *Proc. R. Soc. Lond. B*, 1931, **108**, 340.
- [56] A. Windaus, A. Lüttringhaus, M. Deppe, *Liebigs Ann. Chem.*, 1931, **489**, 252.
- [57] A. Windaus, O. Linsert, A. Lüttringhaus, G. Weidlich, *Liebigs Ann. Chem.*, 1932, **492**, 226.
- [58] C.K. Chuang, *Liebigs Ann. Chem.*, 1933, **500**, 270.
- [59] L. Velluz, G. Amiard, A. Petit, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1949, **16**, 501.
- [60] L. Velluz, G. Amiard, B. Goffinet, *Bull. Soc. Chim. France*, 1955, **22**, 1341.
- [61] E. Havinga, *Experientia*, 1973, **29**, 1181.
- [62] A. Windaus, W. Thiele, *Liebigs Ann. Chem.*, 1936, **521**, 160.
- [63] I.M. Heilbron, K.M. Samant, F.S. Spring, *Nature (London)*, 1935, **135**, 1072.
- [64] J. Waddell, *J. Biol. Chem.*, 1934, **105**, 711.
- [65] A. Windaus, H. Lettré, F. Schenck, *Liebigs Ann. Chem.*, 1935, **520**, 98.
- [66] A. Windaus, F. Schenck, F. v. Werder, *Z. Physiol. Chem.*, 1936, **241**, 100.
- [67] H. Brockmann, *Z. Physiol. Chem.*, 1936, **241**, 104.
- [68] A. Windaus, F. Bock, *Z. Physiol. Chem.*, 1937, **245**, 168.
- [69] A. Windaus, B. Guntzel, *Liebigs Ann. Chem.*, 1939, **538**, 120.
- [70] D. Crowfoot, J.D. Dunitz, *Nature*, 1948, **162**, 608.
- [71] U. Deichmann, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2002, **41**, 1310.
- [72] M. Dunikowska, L. Turko, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2011, **50**, 10050.

NIEORGANICZNE NANOCZĄSTKI W MEDYCYNIE NUKLEARNEJ

INORGANIC NANOPARTICLES IN NUCLEAR MEDICINE

Agata Kasperek, Aleksander Bilewicz

*Institut Chemii i Techniki Jądrowej, Centrum Radiochemii i Chemii Jądrowej
ul. Dorodna 16, 03-195 Warszawa
e-mail: a.kasperek@ichtj.waw.pl*

Abstract

Wstęp

1. Charakterystyka nanocząstek stosowanych w medycynie
2. Mechanizmy kumulowania się nanocząstek w zmienionych chorobowo tkankach – transport bierny i czynny
 - 2.1. Transport bierny
 - 2.2. Transport czynny
3. Struktury nanocząstek nieorganicznych
 - 3.1. Nanocząstki złota
 - 3.2. Nanocząstki tlenku żelaza
 - 3.3. Kropki kwantowe
 - 3.4. Nanozeolity
 - 3.5. Nanocząstki srebra

Podsumowanie i perspektywy na przyszłość

Piśmiennictwo cytowane



Mgr Agata Kasperek ukończyła Wydział Chemiczny Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie w 2006 roku. Od stycznia 2010 roku jest doktorantką w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie. Tematyka jej pracy doktorskiej jest związana z wykorzystaniem nanozeolitów jako nośników radionuklidów i ich potencjalnym zastosowaniem w celowanej terapii radionuklidowej.



Prof. dr hab. Aleksander Bilewicz ukończył studia na Wydziale Chemicznym Uniwersytetu Warszawskiego w 1976 roku. Po studiach rozpoczął pracę w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie, gdzie obecnie jest zatrudniony na stanowisku profesora. W 1986 roku obronił pracę doktorską, której tematyka dotyczyła wymiany jonowej na nieorganicznych sorbentach. W 1998 roku uzyskał stopień dra habilitowanego na podstawie pracy o wpływie efektów relatywistycznych na własności transaktynowców. W 2007 roku otrzymał tytuł profesora. Aktualnie jego zainteresowania naukowe koncentrują się na otrzymywaniu nowych radiofarmaceutyków dla medycyny nuklearnej, szczególnie dla α -immunoterapii.

centrują się na otrzymywaniu nowych radiofarmaceutyków dla medycyny nuklearnej, szczególnie dla α -immunoterapii.

ABSTRACT

Rapid and widespread growth in the use of nuclear medicine for both diagnosis and therapy of disease has been the driving force for a design of novel radiopharmaceuticals. Particularly, recent progress in nanotechnology gives the possibility of designing new carriers for delivering radionuclides in a manner to overcome some limitation such as nonspecific biodistribution and targeting, water insolubility, poor oral bioavailability and others. There are several perspective therapeutic and diagnostic radionuclides which cannot be bound to biomolecule *via* chemical bonds. Nanocarriers gives the opportunity for binding such radionuclides.

Nanoparticles have to be designed with an optimal size (above 100 nm) and surface characteristic to easily penetrate the barriers in the body and prevent elimination by reticuloendothelial system. Among nanoparticles which are used for delivery and targeting are polymers, lipids, viruses, organometallic compounds, precious metals or metal oxides.

This article presents a brief review of the applications, advantages, difficulties and future perspective of inorganic nanoparticles, which can be used as radionuclide delivery systems. The main direction of developing new nanostructures for nuclear medicine is to create multimodal agents which are suitable for such combined methods as PET/MRI or PET/NIRF. Also combination of diagnostic and therapeutic agents in one nanocontainer is possible.

Keywords: nanoparticle, nuclear medicine, drug delivery system, drug carriers,

Słowa kluczowe: nanocząstki, medycyna nuklearna, system transportu leków, nośniki leków

WSTĘP

Następujący w ostatnich latach gwałtowny rozwój metod diagnostyki medycznej, a szczególnie medycyny nuklearnej pozwala wykrywać zmiany patologiczne, zwłaszcza nowotworowe, w bardzo wczesnym stadium ich rozwoju, a zatem rozpocząć leczenie znacznie wcześniej niż przy stosowaniu klasycznych metod diagnostycznych. Dzięki temu diagnostyczne metody medycyny nuklearnej szczególnie pozytonowa tomografia (PET) – są dziś niezastąpionym narzędziem lekarza, zarówno diagnosty, jak i terapeuty, który łatwo może kontrolować przebieg procesu leczenia [1].

Także toksyczny efekt promieniowania jonizującego, znany już od czasu odkrycia promieniotwórczości przez Henri Bequerela i małżonków Curie, znalazł zastosowanie medyczne. Rutynową metodą leczenia nowotworów jest naświetlanie chorych tkanek zewnętrznymi źródłami promieniowania. Metoda ta ma jednak wiele ograniczeń takich jak konieczność dokładnej lokalizacji guzów, niemożność leczenia bardzo drobnych i rozsianych przerzutów, czy duże deponowanie dawki promieniowania na sąsiednich zdrowych tkankach. Aby uniknąć tych ograniczeń, w ostatnich latach, opracowano alternatywną metodę celowanej radioterapii, w której naświetlanie chorej tkanki następuje poprzez nakierowany na nią radionuklid.

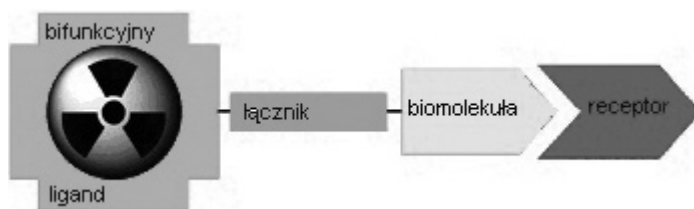
Zarówno w diagnostyce, jak i terapii aby selektywnie nakierować radionuklid na chorą tkankę musi być on przyłączony chemicznie do tzw. wektora – substancji biologicznie aktywnej wykazującej powinowactwo do chorobowo zmienionych komórek. W zależności od tego czy dany radiofarmaceutyk będzie miał zastosowanie diagnostyczne czy terapeutyczne, radioizotop wchodzący w jego skład powinien charakteryzować się odpowiednimi właściwościami radiochemicznymi. W diagnostyce pojedynczego fotonu (SPECT) stosowane są radionuklidy emitujące promieniowanie gamma, o energii zawierającej się najlepiej w zakresie 100–250 keV, zaś w metodzie PET wykorzystuje się radionuklidy emitujące cząstki β^+ , które anihilując z napotkanymi elektronami powodują powstanie dwóch fotonów o energii 511 keV, emitowanych pod kątem 180° [2]. Zarówno fotony emitowane przez emitery γ , jak i powstałe z anihilacji cząstek β^+ kwanty gamma mają możliwość przenikania przez tkanki i mogą być rejestrowane przez odpowiednie detektory na zewnątrz organizmu. Celem podawania pacjentom radiofarmaceutyków diagnostycznych jest uzyskanie obrazu morfologicznego chorego organu, a także zbadanie czynności tkanki lub narządu, w którym zgromadził się radionuklid. Często również radiofarmaceutyki diagnostyczne używane są do planowania terapii oraz monitorowania efektywności wybranej metody leczenia [3, 4].

W radioterapii wewnętrznej wykorzystuje się radionuklidy, emitery promieniowania korpuskularnego, które przyłączone do cząsteczek biologicznie aktywnych selektywnie akumulują się w chorej tkance. Wyjątkową zaletą „celowanej” radioterapii jest możliwość niszczenia chorych tkanek bez uszkodzania zdrowych. Ma to szczególne znaczenie w przypadku małych guzów nowotworowych we wczesnym stadium rozwoju, a także drobnych przerzutów nowotworowych. Ograniczeniem

zastosowania „celowanej” radioterapii jest konieczność znalezienia odpowiednich receptorów na komórkach nowotworowych oraz cząsteczek biologicznie aktywnych wykazujących powinowactwo do tych receptorów. Jednakże według ostatnich danych literaturowych [5] można się spodziewać znalezienia dla mniej więcej połowy rodzajów nowotworów odpowiednich cząsteczek biologicznie aktywnych, które mogą być wykorzystane w „celowanej” radioterapii.

W zależności od wielkości chorej tkanki, tak dobiera się radionuklid, aby efekt terapeutyczny był optymalny. I tak dla dużych guzów nowotworowych najodpowiedniejsze okazały się radionuklidy emitujące wysokoenergetyczne promieniowanie β^- (^{90}Y , ^{188}Re). Jednak medycyna nuklearna zgłasza także duże zapotrzebowanie na radiofarmaceutyki wykazujące efekt terapeutyczny w stosunku do małych zmian nowotworowych rozsianych na dużej powierzchni tkanki, przerzutów nowotworowych lub nowotworów we wczesnym stadium rozwoju. Te warunki mogą spełniać emiterzy miękkiego promieniowania β^- , elektronów Augera oraz emiterzy promieniowania α .

Nowoczesne radiofarmaceutyki receptorowe składają się z 4 części (Rys. 1): radionuklidu, bifunkcyjnego liganda, cząsteczki łączącej ligand z biomolekułą (linkera) oraz biomolekuły. Radionuklid, gdy jest kationem metalu, jest związany z chelatowym ligandem bifunkcyjnym, który poprzez cząsteczkę linkera łączy się z biomolekułą.



Rysunek 1. Schemat nowoczesnego radiofarmaceutyku receptorowego
Figure 1. Scheme of the modern receptor radiopharmaceutical

Biomolekułą może stanowić przeciwciało monoklonalne, jego fragment lub peptyd mający powinowactwo do receptorów komórek nowotworowych. Dzięki temu, po wprowadzeniu radiofarmaceutyku do organizmu, biomolekuła zachowuje się jak wektor, który kieruje radiofarmaceutyk do komórek nowotworowych i wiąże się z ich receptorem.

Celowana terapia radionuklidowa jest bardzo dynamicznie rozwijającą się dziedziną. Istnieje wiele prac przeglądowych, w których zostały szczegółowo omówione terapeutyczne i diagnostyczne radiofarmaceutyki [2–8]. Przy projektowaniu nowych radiofarmaceutyków głównym zadaniem dla chemika jest opracowanie metody, za pomocą której można trwale wiązać izotop promieniotwórczy oraz połączyć go z biomolekułą. Przeważająca większość radionuklidów stosowanych w radiofarmacji to metale, które mają zdolność do tworzenia trwałych związków kompleksowych. Związane są one z biomolekułą zazwyczaj przez multidentne,

głównie poliamino-polikarboksyłowe liniowe, bądź cykliczne ligandy [9]. Także przyłączenie radionuklidów z grupy fluorowców takich jak ^{18}F , $^{76,77}\text{Br}$, $^{123,124,125,131}\text{I}$ nie nastęrcza większych trudności. Istnieją jednak radionuklidy, które posiadają bardzo atrakcyjne dla medycyny nuklearnej właściwości jądrowe, jednakże nie tworzą one trwałych połączeń kompleksowych. Do tej grupy można zaliczyć diagnostyczne radionuklidy takie jak ^{201}Tl , $^{82\text{m},83}\text{Rb}$ czy, ^{83}Sr , które jako kationy pierwszej i drugiej grupy nie tworzą wystarczająco trwałych połączeń chelatowych. Podobnie trudno jest związać z biomolekułą bardzo atrakcyjne radionuklidy terapeutyczne takie jak β^- emitery ^{111}Ag , $^{198,199}\text{Au}$ czy α emitery ^{211}At , $^{223,224}\text{Ra}$.

Większość α emiterów w wyniku rozpadu tworzy inne stosunkowo długożyjące radionuklidy i utrzymanie takich par w związku kompleksowym jest bardzo trudne ($^{212}\text{Pb} \rightarrow ^{212}\text{Bi}$, $^{225}\text{Ac} \rightarrow ^{213}\text{Bi}$ czy $^{230}\text{U} \rightarrow ^{226}\text{Th}$). Dlatego też, poszukuje się innych rozwiązań pozwalających trwale związać wymienione radionuklidy.

Tu z pomocą przychodzi nanotechnologia. Wykorzystując nanocząstki można związać niektóre radionuklidy, które nie tworzą trwałych związków kompleksowych [10,11]. W ostatnim dziesięcioleciu zostało opracowanych wiele układów nanocząstkowych pozwalających na transport radionuklidów. Do organicznych nanocząstek wykorzystywanych w medycynie nuklearnej należą lipidy, materiały polimerowe w formie m.in. miceli, dendrymery. Spośród nich najlepiej zbadane i najbardziej perspektywiczne są liposomy [10, 12–14]. W niniejszej pracy zostaną omówione nanocząstki nieorganiczne, które znalazły zastosowanie w medycynie nuklearnej takie jak, nanocząstki złota, nanocząstki tlenku żelaza, nanocząstki srebra, nanozeolity oraz kropki kwantowe.

1. CHARAKTERYSTYKA NANOCZĄSTEK STOSOWANYCH W MEDYCYNIE

Rozwój nanotechnologii prowadzi do coraz szerszego wykorzystania nanomateriałów w medycynie. Są one używane jako znaczniki bądź platformy dla znaczników diagnostycznych w obrazowaniu molekularnym, czynniki antybakteryjne oraz nośniki do selektywnego dostarczania leków. Stosowane zarówno w diagnostyce jak i terapii nanocząstki mają średnice mniejsze niż 100 nm, czyli posiadają rozmiary podobne do jednostek biologicznych takich jak wirusy, cząsteczki DNA czy białka [15].

W przypadku leków przeciwnowotworowych, aby leczenie było efektywne lek musi pokonać wszystkie wewnętrzne bariery w organizmie i dotrzeć do komórek nowotworowych, przy minimalnej utracie aktywności w krwioobiegu. Ponadto, po dotarciu do chorej tkanki lek powinien selektywnie zniszczyć komórki nowotworowe z jak najmniejszym oddziaływaniem na komórki zdrowe. Nanocząstki są strukturami, które potencjalnie mogą spełniać oba kryteria [11].

Nanocząstki, aby efektywnie pełnić rolę nośnika i dostarczać dawkę terapeutyczną do komórek nowotworowych, muszą mieć zdolność pozostawania w krwio-

obiegu odpowiednio długo zanim zostaną z niego wydalone. Przeważnie nanocząstki, których powierzchnia nie jest zmodyfikowana są wyłapywane w krwioobiegu przez makrofagi układu fagocytarnego, głównie komórki siateczkowo-śródbłonkowe gwiaździste wątroby i śledziony. Czas przebywania we krwi takich niezmodyfikowanych układów zależy od rozmiaru oraz kształtu cząstek. Można zatem wpływać na los nanocząstek we krwi poprzez modyfikację ich rozmiaru oraz powierzchni.

Jedną z istotnych zalet nanocząstek jest możliwość syntezy cząstek o określonych rozmiarach. Stosowane jako nośniki leków muszą mieć rozmiary na tyle duże, aby uniknąć gwałtownego przenikania przez naczynia krwionośne, ale również na tyle małe, aby makrofagi systemu fagocytarnego nie mogły ich wyłapać. Rozmiar sinusoid śledziony oraz komórek Kupffera wątroby waha się pomiędzy 150 a 200 nm, a wielkość szczelin pomiędzy komórkami wyścielającymi wewnętrzną stronę naczyń krwionośnych nowotworu wynosi od 100 do 600 nm. W zawiązku z tym średnica nanocząstek powinna być nie większa niż 100 nm, tak aby mogły one przejść przez obie struktury naczyniowe i dotrzeć do komórek nowotworowych.

Jak już wcześniej wspomniano, poza rozmiarem równie ważnym czynnikiem, wpływającym na farmakokinetykę i biodystrybucję nanocząstek po wprowadzeniu do krwioobiegu jest charakterystyka ich powierzchni. Nanocząstki, aby uniknąć wychwycenia przez makrofagi muszą mieć silnie hydrofilową powierzchnię. Jedną z możliwości zwiększenia ich hydrofilowości jest pokrycie powierzchni nanocząstek hydrofilowym polimerem, takim jak np. polietylenoglikol [14].

2. MECHANIZMY KUMULOWANIA SIĘ NANOCZĄSTEK W ZMIENIONYCH CHOROBOWO TKANKACH – TRANSPORT BIERNY I CZYNNY

2.1. TRANSPORT BIERNY

Zastosowanie odpowiednich nanocząstek umożliwia immobilizowanym w nich substancjom aktywnym przenikanie bezpośrednio do organów i komórek zmienionych chorobowo. Osiągnięcie miejsc docelowych w organizmie przez nanocząstki odbywa się przy udziale mechanizmów transportu błonowego, zarówno biernego, jak i aktywnego. Nanocząstki o pożądanych rozmiarach i odpowiednio zmodyfikowanej powierzchni, zapobiegającej ich wychwytowi przez układ fagocytarny organizmu, mogą pozostawać w krwioobiegu przez odpowiednio długi czas, zanim osiągną docelowe miejsce działania. Z kolei selektywnemu gromadzeniu się makromolekuł, w tym również nanocząstek, w komórkach nowotworu sprzyja specyfika budowy struktury naczyniowej guza oraz mechanizmy biernego transportu błonowego.

Szybki wzrost komórek nowotworowych możliwy jest między innymi dzięki sprawnym procesom angiogenezy, tj. tworzenia nowych, lub rearanżacji już istniejących naczyń krwionośnych w obrębie i poblizu masy guza w celu stałego zaopa-

trywania ją w tlen i składniki odżywcze [16,17]. Jednak brak równowagi w działaniu regulatorów angiogennych, takich jak czynniki wzrostu (VEGF) i metaloproteinazy macierzy, pociąga za sobą dużą dezorganizację naczyń nowotworowych przejawiającą się występowaniem w ich strukturze wielu porów, powiększone przerwy śródwęzłowe pomiędzy komórkami wewnętrznej ściany naczyń krwionośnych. Te cechy powodują, że makromolekuły, takie jak nanocząstki, o ciężarze cząsteczkowym powyżej 50 kDa, mogą przenikać przez pory naczyń nowotworowych i selektywnie gromadzić się w nowotworowej tkance śródmiąższowej. Ten typ transportu biernego jest określany jako „podwyższona przenikalność i retencja” (ang. *Enhanced permeation and retention, EPR*) [10, 14, 18].

Kolejnym czynnikiem wpływającym na bierny transport nanocząstek jest mikrośrodowisko nowotworowe. Szybki wzrost komórek nowotworowych związany jest z intensywnym metabolizmem. W guzach nowotworowych ilości tlenu i składników odżywczych dostarczanych przez naczynia krwionośne zwykle nie wystarczają do pełnego zaspokojenia zapotrzebowania energetycznego komórek. Do celów energetycznych komórki nowotworowe wykorzystują przede wszystkim glikolizę, co z kolei powoduje zakwaszenie ich mikrośrodowiska. Nanocząstki wrażliwe na zmiany pH można projektować w taki sposób, aby wykazywały największą stabilność w pH fizjologicznym (o wartości 7,4), natomiast rozpadały się i uwalniały aktywny lek dopiero w pH niższym od fizjologicznego, czyli w warunkach charakterystycznych dla mikrośrodowiska komórek nowotworowych [18].

2.2. TRANSPORT CZYNNY

System dostarczania leku oparty na transporcie biernym posiada wiele ograniczeń. Specyficzność transportu leku jest stosunkowo niska [18]. Ponadto, większe zmiany nowotworowe wykazują słabsze unaczynienie, zwłaszcza w obszarach martwiczych, co uniemożliwia lokalizację nanocząstek w tym miejscu [15].

W celu przezwyciężenia tych ograniczeń zostały opracowane nośniki nanocząstkowe nowej generacji oparte na tzw. transporcie aktywnym. Nanocząstki, będące nośnikiem radionuklidu zostały połączone z cząsteczką biologicznie aktywną, która ma możliwość rozpoznania antygenów lub receptorów znajdujących się na powierzchni komórek nowotworowych. Przykładem cząsteczki mającej powinowactwo do receptorów wielu ludzkich nowotworów jest kwas foliowy [13]. Także niektóre peptydy takie jak analogi somatostatyny [19], bombezyna [20], czy substancja P [21] wykazują duże powinowactwo do receptorów na komórkach nowotworowych. Innymi cząsteczkami biologicznie aktywnymi cieszącymi się dużym zainteresowaniem są przeciwciała monoklonalne lub ich mniejsze fragmenty [19], a ostatnio także nanociała (ang. *nanobodies*) – najmniejsze fragmenty naturalnie występujących, jednodomenowych przeciwciał, które wykazują pełną aktywność mimo nieobecności lekkiego łańcucha. Fragmenty te cechuje takie samo powinowactwo do antygenów, co dziesięć razy większe przeciwciała [22]. Zarówno prze-

ciwciała monoklonalne, ich fragmenty, jak i nanociała wykazują duże powinowactwo do antygenów szeregu nowotworów np. chłoniaków (ang. *Non-Hodgking's Lymphoma*) [15].

3. STRUKTURY NANOCZĄSTEK NIEORGANICZNYCH

Nanocząstki mające służyć jako nośniki radionuklidów w celowanej terapii są projektowane tak, aby izotopy promieniotwórcze mogły zostać zamknięte we wnętrzu nanocząstki, bądź przyłączyć się bardzo trwale do jej powierzchni. Do zaprojektowania odpowiednich systemów można użyć wielu związków nieorganicznych, do których należą: nanocząstki złota, kropki kwantowe, nanocząstki tlenku żelaza, nanozeolity czy nanocząstki srebra.

3.1. NANOCZĄSTKI ZŁOTA

Zarówno wartość energii promieniowania β^- jak i czas połowicznego zaniku izotopu ^{198}Au ($t_{1/2} = 2,7$ dnia; $E_{\max}(\beta^-) = 0,96$ MeV) pozwalają na wykorzystanie ^{198}Au w terapii radionuklidowej do efektywnego niszczenia tkanek i komórek nowotworowych. Już w 50 latach ubiegłego wieku radionuklid ^{198}Au był stosowany w praktyce medycznej, głównie w brachyterapii raka prostaty. Radioaktywne złoto było umieszczane w cienkich platynowych kapsułach o średnicy 0,1 mm, co niestety wpływało na osłabienie dostarczanej dawki. Rozwój nanotechnologii dostarczył narzędzi do syntezy radioaktywnych nanocząstek złota i wprowadzenia ich do terapii. Pozwoliło to na ustabilizowanie radioaktywnego złota, bez konieczności dodatkowej kapsulacji, co pozwoliło na bezpośrednie dostarczanie dawki promieniowania β^- o wysokim natężeniu [23].

Nowatorska metoda syntezy nanocząstek złota została opracowana przez zespół z Uniwersytetu w Missouri (University of Missouri Research Reactor) [23–25,]. Nanocząstki złota otrzymywane były na drodze reakcji radioaktywnego roztworu $\text{Na}^{198}\text{AuCl}_4$ z inicjatorem – trimeryczną alaniną ($\text{P}(\text{CH}_2\text{NHCH}(\text{CH}_3)\text{COOH})_3$). W ten sposób uzyskano nanocząstki o rozmiarze 15–20 nm. W wyniku reakcji, poza nanocząstkami złota, powstaje biologicznie niegroźna alanina oraz kwas fosforowy. Uzyskane nanocząstki były stabilizowane za pomocą gumy arabskiej, co zapobiegało aglomeryzacji. Następnie radioaktywne nanocząstki były wstrzykiwane bezpośrednio do ludzkiego guza prostaty wszczepionego myszom. Uzyskane wyniki dowiodły, że radioaktywne nanocząstki złota pozostały w obszarze guza nowotworowego, a aktywność która pojawiła się w zdrowych organach w 24 h od momentu aplikacji była zaniedbywalna [23].

Aby zwiększyć specyficzność receptorową nanocząstek złota, w kolejnym kroku opracowano biokoniuugat, gdzie sfunkcjonalizowane nanocząstki połączono z biomolekułą. Peptydem mającym pełnić funkcje wektora była bombezyna, która charakte-

ryzuje się powinowactwem do receptorów GRP. Nadekspresja tego typu receptorów występuje właśnie w nowotworach prostaty. Podczas badań klinicznych radiofarmaceutyki oparte na bombezynie znakowane ^{99m}Tc zostały podane pacjentom z rakiem prostaty [26]. Badania te potwierdziły gromadzenie się aktywności w guzie prostaty, a tym samym gromadzenie się bombezyny w tym miejscu, co w perspektywie może mieć zastosowanie w diagnostyce tego typu nowotworów [26].

Jeżeli radionuklid ^{99m}Tc zastąpimy ^{198}Au możemy skonstruować radiofarmaceutyk mający zastosowanie równocześnie diagnostyczne i terapeutyczne. Badania z wykorzystaniem radioaktywnych nanocząstek złota skoniugowanych z bombezyną zostały przeprowadzone na myszach. Zwierzęta te stanowią jeden z najlepszych modeli do badania, ponieważ posiadają ogromną ilość receptorów na komórkach wydzielających gastrynę, zlokalizowanych w trzustce. Spodziewano się więc dużej kumulacji biokoniugatu w tym organie. Wyniki badania potwierdziły jego gromadzenie się we wszystkich organach posiadających receptory GRP. Obecność radioaktywności w pozostałych organach była nieznaczna. Wykazano zatem, że biokoniugat radioaktywnych nanocząstek złota i bombezyny wykazuje dużą specyficzność w stosunku do receptorów GRP guza prostaty [26].

Trzeba także zaznaczyć, że ogromną zaletą nanocząstek złota jest możliwość łatwej funkcjonalizacji ich powierzchni poprzez trwałe połączenia z grupami tiolowymi biomolekuł. Zbadano także możliwość wykorzystania nanocząteczek złota jako platformy dla ^{18}F – znacznika w technice tomografii pozytonowej oraz przeciwciała anti-metadherin wykazującego specyficzność do komórek raka piersi. Otrzymany radiobiokoniugat badano *in-vitro* na komórkach raka piersi MCF7 i stwierdzono dodatkowo zwiększenie apoptozy komórek z 2 do 20% [27].

W innej pracy, do pokrytej warstwą polietylenoglikolu nanocząstki złota przyłączono chimeryczny peptyd zawierający motyw amino-kwasowy RGD (rozpoznający integrynę $\alpha_v\beta_3$) oraz radionuklid ^{125}I . W badaniach *in-vivo* SPECT/CT zaobserwowano, że radiobiokoniugat gromadził się w tkance guza nowotworowego już po 10 min [28].

3.2. NANOCZĄSTKI TLENKU ŻELAZA

Obrazowanie NMR (ang. *Magnetic Resonance Imaging, MRI*) jest to nieinwazyjna technika diagnostyczna pozwalająca na uzyskanie obrazu wnętrza organu. Oparta jest ona na zjawisku jądrowego rezonansu magnetycznego. Zjawisko to zachodzi w próbce zawierającej jądra atomów, których spin jest różny od zera. Ponieważ jądro żelaza posiada niezerowy spin, dlatego jako środki kontrastowe nanocząstki tlenku żelaza są najczęściej wykorzystywane w technice MRI. Jedna cząstka zawiera tysiące atomów żelaza, co daje bardzo wysoką wartość relaksacji T_2 . Ogromną zaletą metody MRI jest uzyskiwanie znakomitych obrazów tkanek miękkich [11].

Jak wiadomo w badaniach metodą PET/CT otrzymujemy bardzo precyzyjny obraz miejsc akumulacji radiofarmaceutyku. Jest to obraz zarówno anatomiczny

(CT), jak i czynnościowy (PET). Jednakże w przypadku lokalizacji radionuklidu w tkankach np. podbrzusza obszar ten jest mało widoczny, ze względu na brak możliwych do zidentyfikowania struktur anatomicznych. Ten problem można wyeliminować poprzez połączenie metod MRI z PET. Wykonując jednocześnie badanie PET/MRI można nie tylko diagnozować nowotwory różnego typu, ale także przeprowadzać badania neurologiczne i wiele innych [10]. Stąd też istnieje potrzeba opracowywania innowacyjnych radiofarmaceutyków, które będą służyły jako kontrast w tej dualnej metodzie obrazowania. Idealnie nadają się do tego nanoplatformy tlenku żelaza połączone z radionuklidem emitującym promieniowanie β^+ .

Ze względu na magnetyczne przyciąganie, nanocząstki tlenku żelaza mają tendencję do tworzenia aglomeratów. Aby nanocząstki te można było zastosować w medycynie nuklearnej muszą być one stabilne, dobrze zdyspergowane w rozpuszczalniku wodnym. W celu ustabilizowania nanocząstek tlenku żelaza należy zmodyfikować ich powierzchnię stosując odpowiedni surfaktant powodujący powstanie podwójnej warstwy elektrycznej lub użyć stabilizatora, który wpłynie na zmianę punktu izoelektrycznego. Najczęściej stosowanymi modyfikatorami tlenków metali są silany z hydrofilowymi grupami funkcyjnymi [29]. Ponadto, cząsteczki modyfikujące pełnią rolę linkera, za pomocą którego można przyłączyć biomolekułę oraz związek kompleksowy radionuklidu.

Zostało opracowanych wiele metod syntezy oraz modyfikacji nanocząstek tlenku żelaza [29, 30, 33]. Lee i in. [30] ustabilizowali nanocząstki tlenku żelaza o rozmiarze 45 ± 10 nm kwasem poliasparaginowym. Na zewnętrznej warstwie znajdowały się grupy funkcyjne $-\text{COOH}$ oraz $-\text{NH}_2$, które następnie wykorzystano do przyłączenia wektora naprowadzającego i związku kompleksowego z radionuklidem. Zastosowano peptyd: arginina-glicyna-kwas asparaginowy, który rozpoznaje integrynę $\alpha_v\beta_3$ oraz związek kompleksowy DOTA- ^{64}Cu do wizualizacji procesu. Bifunkcyjny ligand DOTA został przyłączony do grupy $-\text{COOH}$, natomiast grupa $-\text{NH}_2$ została wykorzystana do wykonania aktywnego estru i przyłączenia peptydu. Następnie zostały przeprowadzone badania *in vitro* oraz *in vivo*, które potwierdziły akumulację radiobiokonjugatu w komórkach nowotworowych. Nastąpił jednak wychwyt leku przez układ fagocytarny. Przyczyną tego mogła być zbyt duża średnica hydrodynamiczna nanocząstek tlenku żelaza [30]. W innej pracy Patel i in. [31] pokryli nanocząstki supermagnetycznego tlenku żelaza cienką warstwą krzemionki do której przyłączono kompleks ^{64}Cu -DOTA poprzez silanizację. Ze względu na powolną farmakokinetykę Choi i in. [32] zastąpili ^{64}Cu dłużej żyjącym radionuklidem ^{124}I . Opisane bimodalne PET-MRI radiofarmaceutyki łączyły bardzo dużą rozdzielczość techniki MRI z wyjątkową czułością techniki PET (10^{-10} – 10^{-12} M).

Innym radioizotopem, który posiada szerokie zastosowanie w metodzie PET jest ^{18}F . Radionuklid ten jest bardzo łatwo dostępny, ponieważ służy on do znakowania fluorodeoksyglukozy – najpopularniejszego radiofarmaceutyku PET. Jednakże połączenie ^{18}F z cząsteczkami biologicznie aktywnymi jest dość trudnym procesem. Aby związać trwale ^{18}F wymagane są stosunkowo ostre warunki syntezy, reakcja

jest wieloetapowa co skutkuje otrzymaniem produktu z niską wydajnością [33, 34]. Alternatywnie została opracowana metoda wykorzystująca podejście tzw. „*click chemistry*”, czyli przeprowadzenie cykloaddycji azydkowo-alkinowej katalizowanej miedzią. Reakcje tego typu nie wymagają ostrych warunków, są proste i chemoselektywne, i mogą być wykorzystane do przyłączenia ^{18}F do powierzchni nanocząstek. W tym celu, nanocząstki tlenku żelaza zostały zmodyfikowane za pomocą dekstryn, które następnie zostały usieciowane epichlorohydryną oraz aminowane. Na tak zmodyfikowanej powierzchni występowały grupy $-\text{N}_3$, które posłużyły do wykonania połączenia z wcześniej przygotowanym ^{18}F -PEG₃. Niewykorzystane grupy funkcyjne mogą w późniejszym etapie posłużyć do przyłączenia peptydu lub przeciwciała monoklonalnego [35].

3.3. KROPKI KWANTOWE

Kropki kwantowe są to pojedyncze kryształy o rozmiarach rzędu kilku nanometrów, których kształt i wielkość mogą być bardzo precyzyjnie kontrolowane poprzez odpowiednio dobrane parametry syntezy (czas trwania, temperatura, cząsteczki liganda) [36]. Zbudowane są one z materiałów półprzewodnikowych: rdzenia (CdSe, CdTe, InP lub InAs) otoczonego warstwą (np. ZnS). Rdzeń kropek kwantowych stanowi materiał posiadający niższe wartości przerwy energetycznej, która oddziela energetyczne pasmo walencyjne od przewodnictwa niż materiał, z którego zbudowana jest warstwa zewnętrzna. Ma to odzwierciedlenie we właściwościach optycznych kropek kwantowych. Widmo emisyjne ma kształt wąskiego, symetrycznego piku, co pozwala na użycie podczas wzbudzenia takiej długości fali, która jest oddalona od maksimum emisji. Wartość emitowanej długości fali (kolor kropek kwantowych) jest zależna od rozmiarów nanocząstek, zatem można ją łatwo kontrolować. Ponadto, w porównaniu z konwencjonalnymi związkami fluorescencyjnymi, kropki kwantowe posiadają wyższą fotostabilność, dłuższy czas życia fluorescencyjnego oraz większą czułość [37].

Użycie kropek kwantowych jako środków kontrastowych do badań *in vivo* ma wiele ograniczeń. Tkanki położone głębiej będą absorbowały część promieniowania fluorescencyjnego emitowanego przez kropki kwantowe co spowoduje, że uzyskane dane nie będą w pełni ilościowe. Jednym z wymogów badań diagnostycznych jest pomiar ilościowy, dlatego też doskonałym rozwiązaniem jest wyznaczenie kropek kwantowych radionuklidami emitującymi cząstki β^+ , wówczas mogą one znaleźć zastosowanie w łączonych metodach obrazowania, jako środki bimodalne podobnie jak nanocząstki tlenku żelaza [37, 38].

Istnieje wiele kropek kwantowych dostępnych handlowo, o różnych rozmiarach oraz grupach funkcyjnych (m. in. aminowych, karboksylowych), zlokalizowanych na powierzchni, za pomocą których można zmodyfikować powierzchnię tych układów lub przyłączyć radioizotop. Dotychczas kropki kwantowe zostały wyznaczone ^{18}F , ^{11}C , ^{64}Cu [28, 29]. Do wyznaczenia kropek kwantowych o aminowych

i karboksylowych grupach funkcyjnych użyto [^{18}F]fluoroetylosyłu oraz [^{11}C]jodku metylu. W przypadku znakowania ^{18}F uzyskano 5% wydajność, natomiast dla radioizotopu ^{11}C ten wynik był znacznie lepszy i wynosił 45% [37].

Radionuklidem ^{64}Cu zostały wyznakowane dostępne handlowo nanocząstki CdSe/ZnS. Kropki kwantowe zostały wcześniej zmodyfikowane przy użyciu polietylenoglikolu (MW 2000), tak aby przedłużyć ich czas półtrwania w krwioobieg. ^{64}Cu została związana z bifunkcyjnym ligandem DOTA i następnie uzyskany związek kompleksowy połączono z polietylenoglikolem na powierzchni nanocząstek (^{64}Cu -DOTA-PEG-QD). Tak przygotowany radiofarmaceutyk podano myszom. Przeprowadzono badania biodystrybucji w zależności od rozmiaru kropek kwantowych (o średnicy hydrodynamicznej 12 nm oraz 21 nm). Zbadano również wpływ obecności polietylenoglikolu na powierzchni nanocząstek na szybkość usuwania radiofarmaceutyku z krwioobiegu. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały prawie natychmiastowe pojawienie się aktywności w wątrobie i śledzionie. Wielkość kropek kwantowych nie miała wpływu na biodystrybucję, jedynie obecność polietylenoglikolu trochę spowolniła gromadzenie się kropek kwantowych w organach układu fagocytarnego [38]. Uzyskane wyniki sugerowały, iż zastosowanie kropek kwantowych w badaniach *in vivo* metodą fluorescencji będzie niemożliwe. W kolejnym kroku użyto kropek kwantowych, w których do układu ^{64}Cu -DOTA-PEG-QD został przyłączony peptyd, składający się z trzech aminokwasów: argininy, glicyny i kwasu asparaginowego, wykazujący powinowactwo do receptorów na komórkach nowotworów centralnego układu nerwowego (glejakach). W tym przypadku również zaobserwowano kumulację radiofarmaceutyku w wątrobie oraz śledzionie, przy czym dodatkowo aktywność pojawiła się w nerkach, mięśniach, a także komórkach nowotworowych. Po raz pierwszy zostały uzyskane wyniki ilościowe z wykorzystaniem kropek kwantowych, co daje możliwość wykorzystania tych układów jako środków bimodalnych. Jedynym niekorzystnym efektem jest znaczna kumulacja radiofarmaceutyku w wątrobie oraz śledzionie. Podejrzewa się, że efekt ten można zmniejszyć w znacznym stopniu poprzez użycie kropek kwantowych o mniejszych rozmiarach [39].

Kennel i in. [40] analizując wyniki badań opisanych powyżej, podjęli próbę zbadania drogi, jaką przebywa radiofarmaceutyk oparty na kropkach kwantowych wewnątrz organizmu. Według autorów, pojawienie się aktywności w innych organach niż docelowe, mogło świadczyć o rozpadzie związku kompleksowego ^{64}Cu -DOTA, bądź wydzieleniu się innych produktów rozpadu radiofarmaceutyku po wprowadzeniu do organizmu myszy. Aby uzyskać bardziej jednoznaczne wyniki, do znakowania kropek kwantowych użyty został radionuklid $^{125\text{m}}\text{Te}$, który stanowił integralną część układu CdTe. Wektorem w tym przypadku było przeciwciało monoklonalne, które miało za zadanie nakierowanie biokoniugatu na receptory znajdujące się w płucach myszy. Równocześnie przeprowadzono badania z użyciem Cd $^{125\text{m}}\text{Te}$, które nie były połączone z przeciwciałem monoklonalne. Okazało się, że niezależnie od tego czy kropki kwantowe połączone były z wektorem czy nie, następowała bardzo szybka lokalizacja radiofarmaceutyku w organach układu fagocytarnego [40].

Połączenie metod obrazowania PET z obrazowaniem optycznym może umożliwić zastosowanie metody bliskiej podczerwieni z sondą światłowodową (NIRF) do uzyskiwania obrazów tkanek głębiej położonych oraz uzyskiwanie danych ilościowych w badaniach tych organów.

3.4. NANOZEOLITY

Zeolity są to nieorganiczne glinokrzemiany o strukturze krystalicznej. Podstawową jednostką budującą strukturę tych związków są tetraedry AlO_4 oraz SiO_4 , które łączą się ze sobą poprzez wspólne atomy tlenu w różne struktury trójwymiarowe. Atom glinu w strukturze zeolitów jest połączony z 4 atomami tlenu, w związku z tym jest na nim gromadzony formalny ładunek ujemny, tak więc siatka zeolitu jest naładowana ujemnie. Aby skompensować ten ujemny ładunek, w sieci zeolitu są obecne przeciwjony o ładunku +1 lub +2, najczęściej są to kationy I i II grupy układu okresowego. Kationy te są labilne i mogą swobodnie poruszać się w sieci zeolitu, co determinuje właściwości jonowymiennie tych związków. Zeolity zawierają w swojej strukturze również słabo związane cząsteczki wody. Sieć przestrzenną zeolitów tworzą kanały oraz połączone nimi komory, w których zlokalizowane są cząsteczki wody oraz kationy.

Syntetyczne zeolity otrzymywane są na drodze syntezy hydrotermalnej. Poprzez dobranie odpowiednich warunków syntezy oraz stosunków molowych reagentów otrzymuje się zeolity o odpowiedniej strukturze, natomiast czas trwania takiej syntezy rzutuje na rozmiar tych związków. W ostatnim dziesięcioleciu zostało opracowanych wiele syntez, podczas których otrzymywane są zeolity o rozmiarach nanometrowych, o różnych strukturach i właściwościach [41–45].

Istnieją jedynie dwa doniesienia literaturowe dotyczące zastosowania nanozeolitów w medycynie nuklearnej [46, 47]. Tsotsalas, i in. [46] Zbadali możliwość zastosowania biokompatybilnego nanozeolitu typu L o rozmiarach 30 nm do immobilizacji diagnostycznego radionuklidu ^{111}In . Powierzchnia nanozeolitu została zmodyfikowana przy użyciu pochodnej polietylenoglikolu, z grupami silanowymi na jednym końcu. Grupy te posłużyły do przyłączenia cząsteczki modyfikującej do grup Si-OH występujących na powierzchni nanozeolitu. Następnie nanozeolit zmodyfikowany i nie zmodyfikowany został wyznakowany jonami $^{111}In^{3+}$, na drodze wymiany jonowej z jonami K^+ , po czym próbki te zostały zawieszono w roztworze soli fizjologicznej. Okazało się, że znaczny procent aktywności pojawił się w roztworze, co świadczyło o wycieku jonów $^{111}In^{3+}$ ze struktury nanozeolitu do roztworu soli fizjologicznej. Aby temu zapobiec zostały opracowane tzw. cząsteczki zamykające (ang. *stopcock molecules*), które zostały zaprojektowane tak, aby zamknąć kanały odprowadzające nanozeolitu. Cząsteczki „korka” stanowiły związki bifunkcyjne, które z jednej strony posiadały grupę trietoksylanową, pozwalającą na przyłączenie jej do powierzchni nanozeolitu, a z drugiej strony dodatnio naładowany imidazol, który wnikał w kanały nanozeolitu. Następnie, po wypełnieniu nanozeolitu

jonami $^{111}\text{In}^{3+}$ okna jego kanałów zostały „zakorkowane”. Badania trwałości w soli fizjologicznej dowiodły, że kanały te zostały szczelnie zablokowane, gdyż tym razem aktywność nie pojawiła się w roztworze. Zostały również przeprowadzone badania biodystrybucji z użyciem nanozeolitu L wypełnionego ^{111}In . Jednocześnie został podany myszom czysty roztwór $[\text{}^{111}\text{In}]\text{InCl}_3$. Nanozeolit L kumulował się w wątrobie, śledzionie oraz płucach, podczas gdy wolny ^{111}In znaleziono w nerkach oraz we krwi [46].

W drugim doniesieniu [47] zbadano możliwość wykorzystania nanozeolitów do związania radionuklidów ^{223}Ra i ^{224}Ra z biomolekułą. Oba emitery promieniowania α posiadają bardzo atrakcyjne własności jądrowe, które mogłyby być wykorzystane w celowanej radioterapii, jednak związanie ich z biomolekułą poprzez połączenie chelatowe jest niemożliwe. Wykorzystując wysoką selektywność nanozeolitów typu A w stosunku do dużych kationów grupy I i II (Cs^+ , Ba^{2+} i Ra^{2+}) otrzymano trwałą immobilizację ^{224}Ra . Przyłączenie wektora naprowadzającego powinno pozwolić na otrzymanie radiobiokoniugatów przydatnych dla terapii emiterymi α , która jest efektywna przy leczeniu przerzutów i drobnych zmian nowotworowych.

Zastosowanie nanozeolitów jako nośników radionuklidów terapeutycznych lub diagnostycznych wymaga jeszcze dopracowania. Zamykanie kanałów tych struktur oraz modyfikacja ich powierzchni jest czasochłonna, dlatego wykonywanie tych operacji po zaadsorbowaniu radionuklidów nie jest korzystne, zwłaszcza dla izotopów krótkożyciowych.

3.5. NANOCZĄSTKI SREBRA

Radionuklid ^{211}At , emiter promieniowania α , jest obiecującym radionuklidem terapeutycznym, o czasie połowicznego zaniku 7,21 h. Dzięki korzystnym właściwościom jądrowym może on znaleźć zastosowanie w celowanej terapii radionuklidowej deponując dużą dawkę w małej objętości tkanek nowotworowych, nie oddziałując na zdrowe komórki. Do tej pory opracowanych zostało wiele nośników ^{211}At opartych na przeciwciałach monoklonalnych, ich fragmentach oraz hormonach steroidowych [48, 49], jednakże w większości układy te okazały się niestabilne. Związanie zaś astatu w nanocząstkach liposomów czy nanorurkach węglowych było procesem długim i skomplikowanym [50].

Wykorzystując bardzo duże powinowactwo ciężkich chlorowców do metalicznego srebra, Lebeda i in. [51] zaproponowali związanie ^{211}At na nanocząstkach srebra. W badaniach zostały wykorzystane komercyjne nanocząstki srebra, które stanowiły rdzeń pokryty białkiem, do którego następnie przyłączony został tlenek polietylenu. Na tak przygotowanym nanonośniku osadzono ^{211}At . Podczas pierwszych eksperymentów osiągnięto wysoki stopień znakowania, który wynosił ok. 95%. Wyznakowane nanocząstki były stabilne, nawet w obecności nadmiaru jonów chlorkowych. Według autorów, nanocząstki srebra z immobilizowanym ^{211}At mogą znaleźć zastosowanie w terapii wykorzystując bierny transport nanocząstek

(EPR) lub po modyfikacji tlenku polietylenu mogą zostać przyłączone do wektora naprowadzającego je do chorych tkanek.

PODSUMOWANIE I PERSPEKTYWY NA PRZYSZŁOŚĆ

Jak dotychczas ukazało się niewiele prac dotyczących znakowanych radionuklidami nanocząstek nieorganicznych mających zastosowanie terapeutyczne lub diagnostyczne. W przypadku obrazowania molekularnego, wyznakowane emiterami γ lub β^+ nanocząstki pozwalają na otrzymanie obrazów które charakteryzują się dużą czułością, przy czym wykonane pomiary odbywają się w sposób ilościowy. Dodatkową zaletą jest możliwość wykorzystania nanoplateform jako nośników różnych kontrastów, co pozwala na wykonanie obrazu więcej niż jedną techniką [11].

W przypadku terapii radionuklidowej zastosowanie nanocząstek pozwoliło na związanie radionuklidów, których w „tradycyjny” sposób nie udało się przyłączyć do biomolekuły. Ponadto, w jednej nanocząstce można było umieścić wiele atomów radionuklidów, podczas gdy do jednego liganda można w zasadzie przyłączyć jedynie jeden atom radionuklidu. Wpływa to istotnie na zwiększenie dawki deponowanej w chorej tkance [52].

Przyszłość nanocząstek w medycynie nuklearnej związana jest z ich multimodalnością polegającą na połączeniu diagnostyki i terapii w jednym radiofarmaceutyku. To nowe podejście nazywane „teranostic” pozwala na zastosowanie spersonalizowanej terapii. Najpierw stosując biokoniuugat znakowany radionuklidem diagnostycznym możemy zbadać, czy obserwuje się gromadzenie radionuklidu w chorej tkance, ustalić optymalną dawkę terapeutyczną i następnie wykorzystując ten sam biokoniuugat znakowany radionuklidem terapeutycznym przeprowadzić proces leczenia [11].

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] L. Królicki, *Wiad. Chem.*, 1999, **53**, 647.
- [2] C.J. Anderson, M.J. Welch, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2219.
- [3] K. Samochocka, *Wiad. Chem.*, 1999, **53**, 661.
- [4] P.A. Schubiger, R. Alberto, A. Smith, *Bioconjugate Chem.*, 1996, **7**, 165.
- [5] V. Tolmachev, J. Carlsson, H. Lundqvist, *Acta Oncol.*, 2004, **43**, 264.
- [6] W.A. Wolkert, T.J. Hoffman, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2269.
- [7] S. Liu, D.S. Edwards, *Bioconjugate Chem.*, 2001, **12**, 7.
- [8] *Handbook of Nuclear Chemistry*, A. Vértes, S. Nagy, Z. Klencsár (eds.), Kluwer Academic Publisher, 2003, **4**, 279.
- [9] A. Majkowska, A. Bilewicz, *Wiad. Chem.*, 2008, **62**, 7.
- [10] G. Ting, C.-H. Chang, H.-E. Wang, T.-W. Lee, *J. Biomed. Biotechnol.*, 2010, **2010**, 17.
- [11] H. Hong, Y. Zhang, J. Sun, W. Cai, *Nano Today*, 2009, **4**, 399.
- [12] M. Hamoudeh, M.A. Kamleh, R. Diab, H. Fessi, *Adv. Drug Deliver Rev.*, 2008, **60**, 1329.

- [13] L. Zhang, F.X. Gu, J.M. Chan, A.Z. Wang, R.S. Langer, O.C. Farokhzad, *Int. J. Clin. Pharm. Th.*, 2008, **83**, 761.
- [14] G. Henriksen, B.W. Schoultz, T.E. Michaelsen, Ø.S. Bruland, R.H. Larsen, *Nucl. Med. Biol.*, 2004, **31**, 441.
- [15] K. Kairemo, P. Erba, K. Bergström, E.K.J. Pauwels, *Curr. Radiopharm.*, 2008, **1**, 30.
- [16] J. Skóra, J. Biegus, A. Pupka, P. Barć, J. Sikora, P. Szyber, *Postępy Hig Med. Dosw.*, 2006, **60**, 410.
- [17] I. Sacewicz, M. Wiktorska, T. Wysocki, J. Niewiarowska, *Postępy Hig Med. Dosw.*, 2009, **63**, 159.
- [18] K. Cho, X. Wang, S. Nie, Z.G. Chen, D.M. Shin, *Clin. Cancer Res.*, 2008, **14**, 1310.
- [19] S. Froidevaux, A.N. Eberle, *Biopolymers (Peptide Science)*, 2002, **66**, 161.
- [20] C.J. Smith, W.A. Volkert, T.J. Hoffman, *Nucl. Med. Biol.*, 2005, **32**, 733.
- [21] D. Cordier, F. Forrer, F. Bruchertseifer, A. Morgenstern, C. Apostolidis, S. Good, J. Müller-Brand, H. Mäcke, J.C. Reubi, A. Merlo, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2010, **37**, 1335.
- [22] L. Olive, T. Gainkam, L. Huang, V. Caveliers, M. Keyaerts, S. Hernot, I. Vaneycken, Ch. Vanhove, H. Revets, P. De Baetselier, T. Lahoutte, *J. Nucl. Med.*, 2008, **49**, 788.
- [23] R. Kannan, A. Zambre, N. Chanda, R. Kulkarni, K. Katti, A. Upendran, C. Cutler, E. Boote, K.V. Katti, *Nanomed. Nanobiotechnol.*, 2012, **4**, 42.
- [24] K.V. Katti, R. Kannan, K. Katti, V. Kattumori, R. Pandrapraganda, V. Rahing, C. Cutler, E.J. Boote, S.W. Casteel, C.J. Smith, J.D. Robertson, S.S. Jurrison, *Czech. J. Phys. Suppl.*, 2006, **D56**, D23-D33.
- [25] N. Chanda, P. Kan, L.D. Watkinson, R. Shukla, A. Zambre, T.L. Carmack, H. Engelbrecht, J.R. Lever, K. Katti, G.M. Fent, S.W. Casteel, C.J. Smith, W.H. Miller, S. Jurisson, E. Boote, J.D. Robertson, C. Cutler, M. Dobrovolskaia, R. Kannan, K.V. Katti, *Nanomedicine-UK*, 2010, **6**, 201.
- [26] N.K. Devaraj, E.J. Keliher, G.M. Thurber, M. Nahrendorf, R. Weissleder, *Bioconjugate Chem.*, 2009, **20**, 397.
- [27] G. Unak, F. Ozkaya, I.E. Medine, O. Kozgus, S. Sakarya, R. Bekis, P. Unak, S. Timur, *Surf. B: Bioint.*, 2012, **90**, 217.
- [28] Y.H. Kim, J. Jeon, S.H. Hong, W.K. Rhim, Y.S. Lee, H. Youn, J.K. Hung, M.C. Lee, D.S. Lee, K.W. Kang, J.M. Nam, *Small*, 2011, **7**, 2052.
- [29] S. Liang, Y. Wang, Ch. Zhang, X. Liu, Z. Liu, R. Xu, Yin, J. *Radioanal. Nucl. Chem.*, 2006, **269**, 3.
- [30] H.-Y. Lee, Z. Li, K. Chen, A.R. Hsu, Ch. Xu, J. Xie, S. Sun, X. Chen, *J. Nucl. Med.*, 2008, **49**, 1371.
- [31] D. Patel, A. Kell, B. Simard, J.X. Deng, B. Xiang, H.Y. Lin, M. Gruwel, G.H. Tian, *Biomaterials*, 2010, **31**, 2866.
- [32] J.S. Choi, J.C. Park, H. Nah, S. Woo, J. Oh, K.M. Kim, G.J. Cheon, Y. Chang, J. Yoo, J. Cheon, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2008, **47**, 6259.
- [33] T. Poethko, M. Schottelius, G. Thumshirn, U. Hersel, M. Herz, G. Henriksen, H. Kessler, M. Schwaiger, H.J. Wester, *J. Nucl. Med.*, 2004, **45**, 892.
- [34] G. Vaidyanathan, R. Zalutsky, *Nat. Prot.*, 2006, **1**, 1655.
- [35] N.K. Devaraj, E.J. Keliher, G.M. Thurber, M. Nahrendorf, R. Weissleder, *Bioconjugate Chem.* 2009, **20**, 397.
- [36] X. Michalet, F.F. Pinaud, L.A. Bentolila, J.M. Tsay, S. Doose, J.J. Li, G. Sundaresan, A.M. Wu, S.S. Gambhir, S. Weiss, *Science*, 2005, **307**, 538.
- [37] M. Patt, A. Schildan, B. Habermann, O. Mishchenko, J.T. Patt, O. Sabri, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 2010, **283**, 487.
- [38] M.L. Schipper, Z. Cheng, S.-W. Lee, L.A. Bentolila, G. Iyer, J. Rao, X. Chen, A.M. Wu, S. Weiss, S.S. Gambir, *J. Nucl. Med.*, 2007, **48**, 1511.
- [39] W. Cai, K. Chen, Z.-B. Li, S.S. Gambhir, X. Chen, *J. Nucl. Med.*, 2007, **48**, 1862.
- [40] S.J. Kennel, J.D. Woodward, A.J. Rondinone, J. Wall, Y. Huang, S. Mirzadeh, *Nucl. Med. Biol.*, 2008, **35**, 501.

- [41] V.P. Valtchev, L. Tosheva, K.N. Bozhilov, *Langmuir*, 2005, **21**, 10724.
- [42] H. Wang, B.A. Holmberg, Y. Yan, *J. Mater. Chem.*, 2002, **12**, 3640.
- [43] B.-Z. Zhan, M.A. White, K.N. Robertson, T.S. Cameron, M. Gharghouri, *Chem. Commun.*, 2001, 1176.
- [44] Y. Hu, Ch. Liu, Y. Zhang, N. Ren, Y. Tang, *Micropor. Mesopor. Mat.*, 2009, **119**, 306.
- [45] R.V. Greiken, J.L. Sotelo, J.M. Menendez, J.A. Melero, *Micropor. Mesopor. Mat.*, 2000, **39**, 135.
- [46] M.M. Tsotsalas, K. Kopka, G. Luppi, S. Wagner, M.P. Law, M. Schäfers, L.D. Cola, *ACSNano*, 2010, **4**, 342.
- [47] A. Kasperk, A. Bilewicz, *J. Labell. Cmp. Radiopharm.*, 2011, **54**, S537.
- [48] G. Vaidyanathan, M.R. Zalutsky, *Phys. Med. Biol.* 1996, **41**, 1915.
- [49] R. Weinreich, *Advances in radiotherapy*, 1997, **61**, 359.
- [50] K.B. Hartman, D.K. Hamlin, D.S. Wilbur, L.J. Wilson, *Small*, 2007, **3**, 1496.
- [51] J. Kuckaa, M. Hruby, C. Konak, J. Kozempel., O. Lebeda, *Appl. Radiat. Isotopes*, 2006, **64**, 201.
- [52] S.M. Moghimi, A.C. Hunter, J.C. Murray, *FASEB J.*, 2005, **19**, 311.

Praa wpłynęła do Redakcji 2 kwietnia 2012

BŁĘKIT MAJÓW, JEDNO Z NAJWAŻNIEJSZYCH OSIĄGNIĘĆ MEZOAMERYKI

MAYA BLUE, ONE OF THE MOST IMPORTANT ACHIEVEMENTS OF MESOAMERICA

Małgorzata Łukarska, Anna Zywert, Stanisław Kowalak

*Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Chemii,
ul. Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań
e-mail: skowalak@amu.edu.pl*

Abstract

1. Historia
 2. Właściwości
 3. Struktura
 - 3.1. Indygo
 - 3.2. Pałygorskit
 - 3.3. Charakter oddziaływania matrycy z barwnikiem
 4. Pigmenty z matrycami sit molekularnych
 - 4.1. Analogi Błękitu Majów z matrycami sit molekularnych
- Podsumowanie
Podziękowania
Piśmiennictwo cytowane
-



małgorzata Łukarska

mgr Małgorzata Łukarska ukończyła studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu A. Mickiewicza w Poznaniu. Podczas studiów realizowała projekt badawczy: „Synthesis and ion exchange of microporous and mesoporous zeolites A, X and sodalite” w ramach wymiany studenckiej „Erasmus” (Erlangen-Niemcy) pod kierownictwem prof. dr Wilhelma Schwigera. Praca magisterska, wykonywana pod kierunkiem prof. dr hab. Stanisława Kowalak, dotyczyła otrzymywania analogów Błękitu Majów w matrycach zeolitów. Obecnie jest doktorantką w Zakładzie Technologii Chemicznej, a jej zainteresowania naukowe nadal skoncentrowane są na syntezie i charakterystyce pigmentów otrzymywanych z użyciem sit

molekularnych. Jest współautorką 1 publikacji i 7 abstraktów pokonferencyjnych.



anna Zywert

mgr Anna Zywert jest doktorantką czwartego roku na Wydziale Chemii UAM. Pracę magisterską dotyczącą katalizycznej dehydratacji alkoholi do eterów symetrycznych wykonywała na Wydziale Chemii Uniwersytetu A. Mickiewicza w Poznaniu, w Pracowni Sit Molekularnych pod kierunkiem prof. dr hab. Stanisława Kowalak. Część badań prowadziła na Uniwersytecie w Barcelonie pod kierunkiem prof. dr Javiera Tejero, gdzie w ramach wymiany studenckiej “Erasmus” realizowała projekt badawczy: „Dehydration of n-heksanol to di-n-hexyl ether”. Studia Doktoranckie rozpoczęła na Wydziale Chemii UAM w Poznaniu, w Zakładzie Technologii Chemicznej, a swoją pasję i zainteresowania

naukowe skoncentrowała na syntezie pigmentów poprzez trwałe wprowadzanie cząsteczek chromoforów (barwników indygooidowych) do wnętrza matryc sit molekularnych. Jest współautorką 9 publikacji i 18 abstraktów pokonferencyjnych.



stanisław Kowalak

prof. dr hab. Stanisław Kowalak ukończył studia chemiczne na Wydziale Mat-Fiz-Chem Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu, w 1968 roku. W tej samej uczelni uzyskał kolejne stopnie naukowe. Obecnie jest profesorem zwyczajnym. Zajmuje się głównie syntezą, modyfikacją i zastosowaniami zeolitów oraz innych sit molekularnych. Odbił szereg staży naukowych w uniwersytetach europejskich i amerykańskich. Prowadzi szeroką współpracę z licznymi ośrodkami naukowymi w kraju i zagranicą, a także z firmami przemysłowymi. Jest autorem około ponad stu pięćdziesięciu publikacji i kilkunastu patentów. Należał do założycieli Polskiego Towarzystwa Zeolitowego, gdzie pełnił funkcję pre-

zesa. Obecnie jest członkiem PTZ oraz International Zeolite Association.

ABSTRACT

The Maya Blue is a famous blue pigment developed by pre-Columbian civilizations of Mesoamerica and manufactured there for about thousand years. It was applied for body decoration, important for cruel religious rituals, as well as for artistic paintings, murals, or coloration of ceramics. Its production was abandoned in XVII century and the procedure forgotten. The chemical nature of this blue pigment remained a puzzle for a long time and only in nineteen sixties it was revealed [1, 2] that it is a composite consisting of inorganic matrix (palygorskite) that accommodates molecules of organic dye – indigo. The preparation procedure was rediscovered [3] and the products analogous to classical Maya Blue could be obtained by simple thermal insertion of indigo into palygorskite (and also into sepiolite). However, the nature of chemical interaction between dye and matrix that provides very high resistibility of resulting pigments remains still not satisfactorily explained. The hydrogen bonds or coordinative interaction with matrix cations are taken into an account. Zeolites and other molecular sieves can be efficiently applied as matrices for pigments similar to Maya Blue. The coloration and other properties of pigments can be considerably changed by initial modification of zeolites with various cations, what supports an important role of complexes formed by dye molecules and zeolite cations. On the other hand, the zeolite-like materials AlPO_4 as well as to some extent mesoporous silica (with some contribution of micropores) lacking any cations are also efficient matrices for pigments analogous to Maya Blue. Not only indigo, but also indigo derivatives (leucoindigo, thioindigo, indigo carmine) could be embedded inside the molecular sieves. The thermal insertion as well as crystallization of zeolites from gels supplemented with respective dye can be used for pigment synthesis. It is interesting that role of matrix can be also played by representative of novel MOF family of the molecular sieves.

Keywords: Maya Blue, pigments, zeolites, indigo, encapsulation

Słowa kluczowe: Błękit Majów, zeolity, pigmenty, enkapsulacja, indygo

1. HISTORIA

Błękit Majów jest „jednym z największych technologicznych jak i artystycznych osiągnięć Mezoameryki” [4], wyróżniającym się nie tylko niepowtarzalnym zabarwieniem od jasnego turkusowego po ciemnozielonkawą odcień, ale i niezwykłą odpornością na działanie światła, wilgoci i czynników chemicznych. Pigment ten otrzymywany był na terenie Mezoameryki (od północnej części półwyspu Jukatan po górskie tereny Gwatemali oraz centralny Meksyk, Nikaraguę oraz Belize) przez ponad tysiąc lat (od VI do XVI wieku). Przez długi czas natura chemiczna tego pigmentu pozostawała nieznana i najczęściej przypuszczano, że jest minerałem z rodzaju azurytu lub lazurytu [5, 6]. Dopiero w latach 60. ubiegłego wieku wykazano, że jest on kompozytem zawierającym organiczny barwnik (indygo) w nieorganicznej matrycy włóknistej gliny (pałygorSKU) [7].



Rysunek 1. Malowidło ściennie z Bonampak zdobione Błękitem Majów [8]
Figure 1. Mural from Bonampak decorated with Maya Blue[8]

Nie zachowały się przekazy opisujące klasyczną metodę syntezy pigmentu, jednakże pionierskie badania van Olphena [3] doprowadziły do jej odtworzenia. Stosując dwie nieco odmienne metody, tzw. „suchą” oraz „mokrą” uzyskał syntetyczne analogii Błękitu Majów. Pierwsza z nich polegała na ucieraniu indygo z pałygorSKU, a następnie ogrzewaniu mieszaniny w temperaturze poniżej 200°C. Druga natomiast koncentrowała się na zwilżaniu pałygorSKU octanem indoksyli bądź też roztworem zawierającym zredukowaną formę granatowego barwnika – leukoindygo (tzw. „barwienie kadzią”), który utleniany tlenem z powietrza prowadził do ponow-

nego formowania indygo. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów autor badań podkreślał, iż powolne ogrzewanie komponentów pigmentu w temperaturze poniżej 150°C jest decydujące w tworzeniu niezwykłego koloru oraz uzyskiwaniu pigmentu o niezwykłych właściwościach chemicznych i fizycznych [9]. Dalsze badania wykazały, iż użycie już niewielkiej ilości (0,5–2%) indygo jest wystarczające do otrzymania stabilnego pigmentu o intensywnym zabarwieniu [3, 10, 11]. Zastąpienie nieorganicznej matrycy pałygorskitu, inną gliną włóknistą o podobnej kompozycji (sepiolitu), nie prowadziło do otrzymania pigmentów o identycznych właściwościach jak oryginalnego klasycznego Błękitu Majów [3].

Na podstawie badań archeologicznych i antropologicznych, dość precyzyjnie określono procedurę stosowaną przez prekolumbijskie cywilizacje. Składniki pigmentu, znane Majom, jako *sak lu'um* (pałygorskit) i *ch'òoh* (indygo) niegdyś stosowane były głównie do celów leczniczych [12], a produkcja Błękitu Majów związana była z obrzędem religijnym. Główną metodą jego preparowania było wypalanie kadzideł stanowiących mieszaninę kopalu, pałygorskitu, jak również części roślin zawierających indygo (*Indigofera suffruticosa*) [12]. Znalezienie w jednej ze świątyń *cenotes* [13], misy zawierającej kopal (pochodzący z terenów Tlateloco, obecnego Meksyku), fragmenty kadzideł, sadzę, oraz pigment potwierdzały słuszność prezentowanego poglądu [13]. Wolne wypalanie kadzideł zapewniało długotrwałe ogrzewanie, jakie jest niezbędne do otrzymania trwałego pigmentu. Kopal znany pod nazwą *pon* pochodził z soku roślinnego [14] i stanowił istotny symbol o praktycznym znaczeniu. Majowie utożsamiali go z krwią drzew tropikalnych i wierzyli, iż stanowi on pożywienie dla bogów [15]. Ofiary z ludzi oraz przedmioty pokryte błękitem majańskim wrzucano do wypełnionych wodą, świętych jaskiń – *cenotes*. Indianie w ten sposób wierzyli, że po porze suchej nastanie deszcz niosący urodzaj. Badania archeologiczne dowodzą, iż składali oni w ofierze głównie chłopców w wieku od 3 do 11 lat, wierzono bowiem, iż takie ofiary satysfakcjonują bogów. Wyjątkowy kolor Błękitu Majów był ponadto symbolem bóstwa [12], a także symbolizował przeistoczenie, a nawet wcielenie boga deszczu Chaacka. Dla prekolumbijskich cywilizacji kolor stanowił część kodowego języka połączonego z ikonografią oraz religią. Niebiesko-zielony kolor utożsamiany był ze świętą wodą, dlatego też był symbolem regeneracji, płodności oraz urodzaju [16].

Pigment był szeroko stosowany w garncarstwie, ceramice oraz malowidłach ściennych [5, 17]. Błękit stanowił tło dla niektórych nawet najbardziej imponujących malowideł, a te pochodzące z Bonampak po dziś dzień stanowią najstarszy materiał ilustracyjny pochodzący z tamtego okresu (VIII w.). Wiele z nich do dziś podziwiać można także w innych meksykańskich miastach tj. Chichén Itzá, Calakmul oraz Cacaxtla. Początki stosowania błękitu nie są znane, jednakże pierwsze wzmianki o jego produkcji i stosowaniu wskazują na 300 r.n.e [18]. Od czasu podboju Meksyku przez konkwistadorów pigment stopniowo popadał w zapomnienie i dopiero w połowie XX w. dzięki archeologom, którzy rozpoczęli wykopaliska na Jukatanie ponownie znalazł się w centrum zainteresowania. Istnieją dowody na to, iż jego otrzymywanie i stosowanie nigdy nie zaprzestano. W XVI i XVII w. stosowano

go do dekoracji kościołów i klasztorów. Jego obecność znaleziono również w kolonialnych budowlach na Kubie pochodzących z XVIII w., a w XIX w. stał się nawet przedmiotem handlowym sprzedawanym pod nazwą „*Havana Blue*” [19, 20].

W 1931 roku po odkryciu przez Merwina [21] niemalże idealnie zachowanych malowideł ściennych pochodzących z ok. VIII w. pigment stał się prawdziwym wyzwaniem dla archeologów jak i chemików. Przykuwał uwagę swoim unikatowym kolorem rozpościerającym się od jasnego turkusowego, przez błękit, aż po ciemnoniebieski kolor [22, 23] oraz swą niebywałą trwałością.

Nazwa „*Maya Blue*” po raz pierwszy pojawia się w literaturze w 1942 roku, w którym to Gettens oraz Stout terminem tym nazywali nowo odkryty pigment [24], a nazwa ta została powszechnie przyjęta.

2. WŁAŚCIWOŚCI

Przez wiele lat naukowcy zastanawiali się, w czym tkwi fenomen błękitu majajskiego oraz co generuje w nim niezwykłą trwałość, bowiem mimo upływu setek lat oraz niekorzystnych warunków klimatycznych pozostawał on ciągle „żywy”. Błękit jest odporny na działanie światła, na upływ czasu, podwyższoną temperaturę (ok. 100°C), a także na działanie stężonych kwasów, alkaliów, rozpuszczalników organicznych, utleniaczy czy też czynników redukujących [25]. Potwierdzeniem jego zdumiewającej stabilności są niemalże idealnie zachowane malowidła ścienne, na których wciąż widnieje niebiesko-turkusowy pigment, który po dziś dzień nie uległ rozkładowi [1, 23, 26].

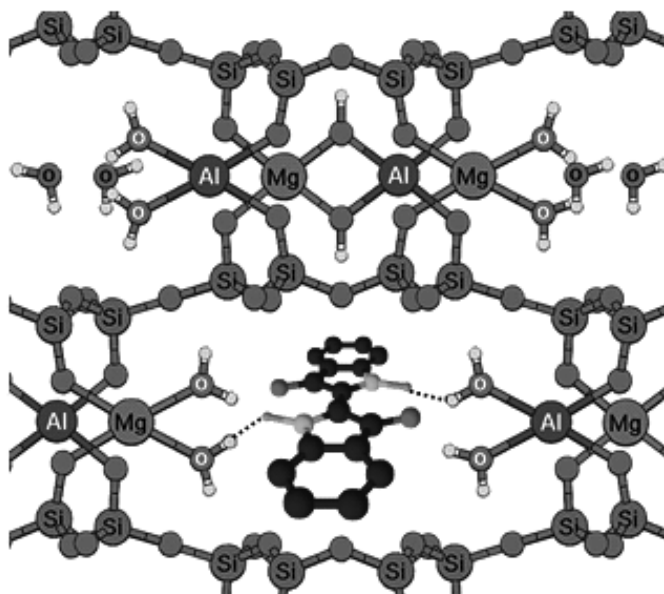
Odporność Błękitu Majów na działanie stężonych kwasów (HNO_3 , H_2SO_4 czy też HCl) jak również wody królewskiej oraz wodorotlenku sodu po raz pierwszy sprawdził Gettens w 1962 roku, i testy te nazywane są od jego nazwiska „*testami Gettensa*” [3, 23]. Analogiczne badania z wykorzystaniem pigmentów zbudowanych z indygo i pałygorskitu, sepiolitu, a także kaolinitu i montmorillonitu przeprowadził Van Olphen. Postulował on, iż uzyskanie stabilnych pigmentów jest możliwe z użyciem glin kanałowych, tj. pałygorskitu i sepiolitu, przy czym podkreślał mniejszą stabilność preparatów zawierających sepiolit. Zastosowanie glin o strukturze laminarnej nie prowadziło do otrzymania trwałych pigmentów [11].

Wkrótce Sánchez del Río [11] potwierdził doniesienia Gettensa. Badając preparaty otrzymane z pałygorskitu i indygo, jak również sepiolitu i indygo poddawał je działaniu kwasów (o różnym stężeniu, czasie traktowania jak i temperaturze). Wykazał powiązanie między zmianą koloru, a strukturą krystaliczną syntetycznego Błękitu Majów. Pigmenty bazujące na sepiolicie charakteryzowały się znacznie niższą odpornością na działanie kwasów i już w temperaturze pokojowej obserwowano ich stopniowe blaknięcie oraz destrukcję struktury krystalicznej. Na podstawie uzyskanych wyników autor badań sugerował, iż termin „*Maya Blue*” powinien być stosowany jedynie do określania pigmentów zawierających w swej strukturze indygo i pałygorskit [11]. Większe stężenie oktaedrycznych jonów Mg^{2+} [27] w sepiolicie

oraz znacznie większe kanały ($0,37 \text{ nm} \times 0,1 \text{ nm}$) w porównaniu z pałygorskitem umożliwiały swobodną dyfuzję cząsteczek kwasów w wewnątrzkrystalicznych przestrzeniach. Przeprowadzone badania dowiodły także, iż niemożliwe jest otrzymanie analogów Błękitu Majów z użyciem montmorillonitu [3, 10, 23, 28], jak i innych krzemianów. Pionierzy tych badań również sceptycznie wypowiedali się na temat możliwości zastosowania matryc zeolitowych [3].

3. STRUKTURA

Podobnie jak charakter chemiczny, tak również struktura Błękitu Majów długo pozostawała nieznaną, a jej rozwikłanie stało się prawdziwym wyzwaniem. Mimo iż pigment był powszechnie znany i stosowany od wieków, to jego strukturę udało się ustalić dopiero w latach 60. XX wieku. Początkowo Gettens na podstawie badań dyfrakcji rentgenowskiej sugerował, iż błękit posiada charakter nieorganiczny, co tłumaczy jego wysoką odporność na działanie kwasów, a głównym jego komponentem jest włóknista glina – *pałygorskit*. To jej początkowo przypisywano odpowiedzialność za niebieski kolor błękitu [29]. W tym samym czasie Shepard [30] na podstawie badań spektralnych (IR) przedstawił nową koncepcję dotyczącą budowy Błękitu Majów, postulując, że pigment oprócz pałygorskitego zawiera także organiczny barwnik – *indygo* [17]. Bazując właśnie na tych doniesieniach van Olphen [3] zrekonstruował metodę otrzymywania Błękitu Majów. Struktura otrzymanych pigmentów zbadana przez Klebera [17] za pomocą spektroskopii w podczerwieni (FTIR) oraz dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego (XRD) została uznana za identyczną ze strukturą oryginalnych próbek. Littmann [23] sugerował, iż składnikiem Błękitu Majów oprócz pałygorskitego może być również montmorylonit. Pogląd ten nie został jednak potwierdzony i połączenie pałygorskitego z indygo zostało uznane za powszechnie dominujące [3, 30]. Z biegiem czasu stwierdzono, że w strukturze pigmentu oprócz pałygorskitego obecne są również domieszki sepiolitu [29, 31]. Jego obecność była bardziej widoczna w pigmentach znajdujących w Imperium Azteków [11, 32], a nie pigmentach jakie otrzymywane były przez starożytnych Majów. José-Yacamán uważał, że na odcień pigmentu może wpływać także obecność soli i tlenków żelaza obecnych w minerałach [33]. Późniejsze badania [10, 26, 34–37] dowiodły, iż unikatowy kolor pigmentu jest wynikiem batochromowego przesunięcia w widmie elektronowym indygo, wynikającego z trwałego połączenia barwnika z nieorganiczną matrycą. W 2006 roku Doménech [38–40] obok indygo w Błękitcie Majów, wykrył również obecność jego utlenionej formy – *dehydroindygo*, co może wyjaśnić swoistą zmienność jego odcieni.



Rysunek 2. Model wodorowego wiązania cząsteczek indygo w Błękitcie Majów
 Figure 2. Model of indigo molecule linked with hydrogen bond in Maya Blue

3.1. INDYGO

Indygo należy do najstarszych barwników stosowanych przez ludzkość, albowiem istnieją dowody na to, iż był obecny w tkaninach znalezionych w egipskich grobach [3, 17]. Wierząco, iż barwnik ten zapewnia nierozzerwalne połączenie z bóstwem i naturą [41, 42], a obecnie popularnie wykorzystywany jest w przemyśle włókienniczym do barwienia bawełny (jeans), a w także wełny [43].

Roślina, z której otrzymywano indygo należała do typu *Indigofera*, a jej różne odmiany typu *Indigofera* były używane przez różnorodne cywilizacje: Indie (*Indigofera tinctoria*), Chiny (*Indigofera indigotica* lub *tein-cheing*), Daleki Wschód (*Polygonum tinctorium*), Europa (*Isatis tinctoria*) [44]. W Europie roślina ta (*Isatis tinctoria*) odgrywała dużą rolę ekonomiczną jak również kulturową w średniowieczu [45], jednakże u schyłku XVII jej znaczenie znacznie osłabło, gdyż roślina dostarczała zbyt mało barwnika w porównaniu z tymi sprowadzonymi z Indii czy Ameryki, a jego cena była wyższa.

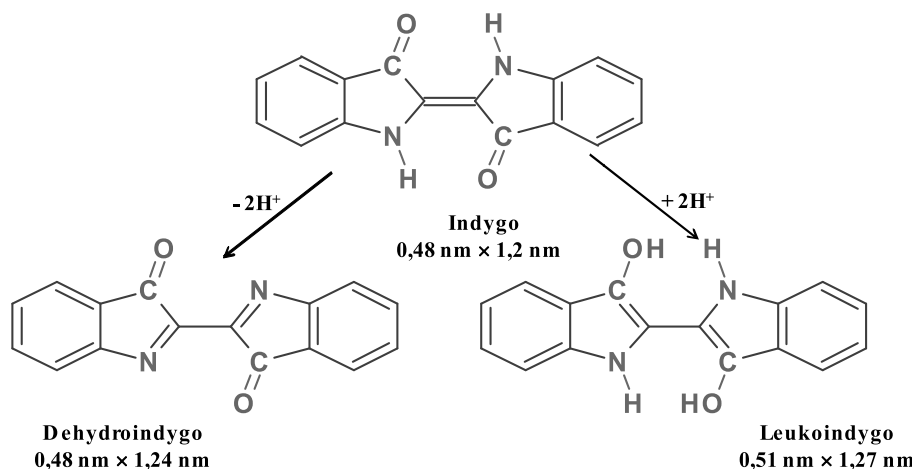
W klimacie umiarkowanym była to dwuletnia roślina ziołowa wytwarzająca w pierwszym roku liście rozety, które następnie zbierano do produkcji indygo, natomiast w drugim roku wytwarzała kwiaty i nasiona [46].

Roślinę ścinano podczas okwiecenia trzy razy w roku, a zebrane pęki układano w kadziach i zalewano wodą o temp. 30–70°C, ekstrahując w ten sposób glikozyd indyga zwany *indykanem*. Podczas procesu następowała hydroliza indykanu pod

wpływem zawartego w niej enzymu, a indoksył był utleniany tlenem z powietrza, co w rezultacie dawało indygo [46, 47].

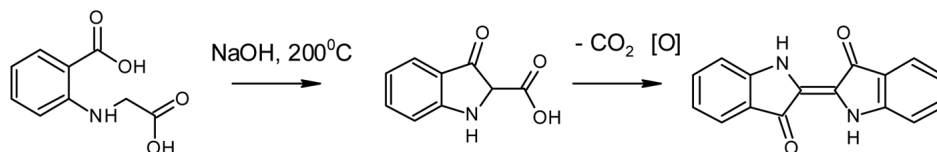
Indygo, znane również pod nazwą „*indygotyna*” lub „*błękit indygowy*” w temperaturze pokojowej i pod normalnym ciśnieniem występuje jako ciemnoniebieski proszek. W stanie stopionym przybiera natomiast barwę czerwoną, a jego pary również są czerwone [46]. W rozpuszczalnikach niepolarnych przyjmuje barwę fioletową, a w polarnych czy po wprowadzaniu do tekstyliów, ma barwę niebieską.

Indygo jest cząsteczką płaską, o przybliżonych wymiarach $0,48 \text{ nm} \times 1,2 \text{ nm}$ [48], a więc jest wystarczająco małą, by móc penetrować w kanałach pałgorskitu [49]. Jego struktura po raz pierwszy została określona przez Bradleya w 1940 roku [48].



Rysunek 3. Modele cząsteczki indygo oraz jego pochodnych
Figure 3. Models of indigo and its derivatives

Pierwsza synteza indygo z izatyny została opisana przez Baeyera w 1870 roku [50], ale znacznie bardziej ekonomiczna metoda została przedstawiona przez Heumanna w 1890 roku [51, 52]. W procesie tym *N*-(2-karboksyfenylo)glicyna ogrzewana jest w atmosferze obojętnej z NaOH do temperatury 200°C .



Rysunek 4. Metoda Heumanna prowadząca do otrzymania indyga
Figure 4. The Heumann method of indigo synthesis

Pierwotny produkt ulega dekarboksylacji, a następnie utlenia się na powietrzu do indygo [53].

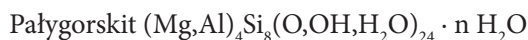
Indygo krystalizuje w układzie jednoskośnym w grupie $P 2_1/C$, a jego temperatura sublimacji wynosi około 390°C [54]. Wykazuje właściwości amfoteryczne dając chlorowoderek w wyniku działania HCl w nieobecności wody oraz zielone połączenie sodowe pod wpływem wodorotlenku sodu [46, 47].

W wodzie oraz wielu powszechnie stosowanych rozpuszczalnikach takich jak alkohol, eter i benzyna indygo jest nierozpuszczalne, natomiast częściowo rozpuszcza się w chloroformie jak i w rozpuszczalnikach wrzących w wysokiej temperaturze np. w nitrobenzenie. Ta słaba rozpuszczalność wynika z silnych wewnętrznych wiązań wodorowych, jakie tworzą cząsteczki indygo. Wiązanie wodorowe może też wyjaśniać stosunkowo wysoką temperaturę sublimacji.

Centralne wiązanie $\text{C}=\text{C}$ między pierścieniami indoksyłowymi, powoduje, iż może ono występować w postaci izomerów *cis* oraz *trans* grup funkcyjnych $\text{C}=\text{O}$ i $\text{N}-\text{H}$ [44]. W stanie stałym i w roztworach indygo przyjmuje konfigurację *trans*, która stabilizowana jest przez dwa wewnątrzcząsteczkowe wiązania wodorowe.

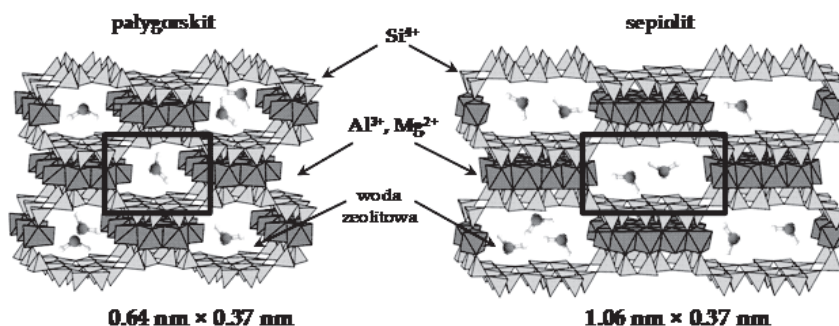
3.2. PAŁYGORSKIT

Obecnie wiadomo, iż Błękit Majów jest organiczno-nieorganiczną hybrydą [55], będącą połączeniem indygo otrzymanego niegdyś z liści roślin oraz pałygorokitu stanowiącego włóknistą glinę. Pałygorokit, jak również sepiolit, zawierają w swojej strukturze kanały, które nadają obu minerałom charakterystyczne właściwości, tj. zdolność do adsorpcji wody i innych związków czy czynników, np. adsorbowanie bakterii powodujących choroby i następnie usuwanie ich z organizmu [56]. Obie gliny należą do tej samej rodziny włóknistych glinokrzemianów o następującej kompozycji [26, 40, 57]:



Przeprowadzone do tej pory badania strukturalne dowodzą, iż sepiolit również był stosowany, jako matryca do preparowania analogów Błękitu Majów [38]. Pałygorokit znany również jako *atapulgit* lub pod nazwą lokalną, jako *sak lu'um* jest używany do tej pory przez społeczność półwyspu Jukatan.

Obie gliny składają się z ciągłych, dwuwymiarowych warstw – tetraedrycznych i oktaedrycznych. Gliny te stanowią mieszaninę dwóch różnych typów jednoskośnego oraz rombowego [58, 59] i charakteryzują się nieciągłym stosunkiem warstw tetraedrycznych do oktaedrycznych wynoszącym 2:1, gdzie jedna jednostka połączona jest z kolejną poprzez inwersję tetraedrów SiO_4 wzdłuż wiązania $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$. Tetraedryczne i oktaedryczne warstwy powodują utworzenie prostokątnych tuneli równoległych do osi x [40].



Rysunek 5. Modele struktur omawianych glin włóknistych
Figure 5. Structure models of the discussed fibrous clay

Pałygorskit zawiera tunele o wymiarach 0,64 nm × 0,37 nm, natomiast sepiolit 1,06 nm × 0,37 nm [40], co jest istotną różnicą pomiędzy tymi dwoma glinami.

Gliny wykazują umiarkowane właściwości jonowymienne, a woda zeolitowa występuje wewnątrz kanałów. Dehydratacja następuje w 150°C w pałygorskicie, a w sepiolicie w 120°C [60].

Małe organiczne cząsteczki takie jak aceton czy pirydyna wykazują zdolność wnikania w kanały sepiolitu po kolejnych procesach odwodnienia, co można tłumaczyć tworzeniem wiązań wodorowych przez wewnętrznie skoordynowaną wodę gliny.

Zerwanie wiązań Si-O-Si na powierzchni gliny kompensowane jest przez ich protonowanie i hydroksylację, z utworzeniem grup silanolowych (Si-OH). Grupy te wykazują dużą skłonność do adsorpcyjnego przyłączania cząsteczek na powierzchni minerału.

Włóknista struktura pałygorskitu czy też sepiolitu może zostać zniszczona pod wpływem silnych kwasów, co zaprzeczałoby niezwyklej odporności samego Maya Blue na ich działanie [23].

3.3. CHARAKTER ODDZIAŁYWANIA MATRYCY Z BARWNIKIEM

Wiele chemicznych i archeologicznych aspektów dotyczących Błękitu Majów, jego występowania, otrzymywania, stosowania czy budowy chemicznej jest już powszechnie znane. Nie ulega wątpliwości, że Błękit Majów jest hybrydowym połączeniem cząsteczek organicznego barwnika i nieorganicznej matrycy. Jednak wciąż otwartym pozostaje pytanie, co generuje jego niezwykłą trwałość? Początkowo sądzono, że wynika ona głównie z unikatowego składu chemicznego [1, 2], ale ciągle pozostaje niewystarczająco wyjaśniona natura oddziaływania między matrycą i barwnikiem.

Kontrowersje budzi nawet miejsce lokalizacji barwnika. Brane było pod uwagę zarówno związanie z powierzchnią zewnętrzną glin, jak i z wewnętrzną powierzchnią

kanałów pałygorskitu (lub sepiolitu). Van Olphen [3] sądził, że cząsteczki indygo są zbyt duże, aby mogły wnikać do kanałów tych minerałów, ponadto stosunkowo niska pojemność adsorpcji pałygorskitu i sepiolitu była dodatkowym argumentem sugerującym, iż cząsteczki barwnika adsorbowane są jedynie na zewnętrznej powierzchni glin włóknistych. Podobny pogląd prezentował Hubbard [10], który używając spektroskopii ^{29}Si i ^{13}C CP/MAS-NMR, wykazał, że cząsteczki barwnika w przeciwieństwie do innych, mniejszych cząsteczek takich jak aceton czy pirydyna, nie wnikają do wnętrza kanałów, pokrywając jedynie zewnętrzną powierzchnię. W myśl jego koncepcji grupy karbonylowe bądź aminowe barwnika tworząc wiązanie wodorowe z grupami silanolowymi zlokalizowanymi na krawędzi kanałów glin, przykrywają ich „wejście”, uniemożliwiając tym samym dyfuzję innych cząsteczek barwnika do przestrzeni wewnętrznych matrycy. Obserwowany spadek powierzchni mikroporów preparowanych analogów Błękitu Majów w stosunku do czystych glin, był dodatkowym argumentem potwierdzającym słuszność prezentowanych poglądów. Podobne doniesienia prezentowane były w literaturze przez Sáncheza del Río [61]. Inna koncepcja budowy Błękitu Majów [64, 65], kwestionowana przez innych naukowców oparta jest na idei, w której, cząsteczki indygo ułożone są w tzw. rowkach, obecnych na zewnętrznej powierzchni glin, powstałych w wyniku pewnych nieciągłości warstw oktaedrycznych bądź tetraedrycznych tzw. pęknięć.

Usunięcie wody zeolitowej, zwykle w temperaturze preparowania pigmentu (powyżej 100°C), jest niezbędnym krokiem do uzyskania łatwo dostępnych, wolnych przestrzeni, w których ostatecznie ułożone są cząsteczki barwnika [66, 67].

Większość prezentowanych poglądów zakłada natomiast penetrację cząsteczek barwnika do kanałów gliny, jako czynnik gwarantujący trwałość powstającego pigmentu.

Jeden z pionierów badań Błękitu Majów, Kleber [17] rozważając rozmiar cząsteczki indyga postulował penetrację cząsteczek do kanałów ilastych minerałów. Badając preparaty otrzymane m.in. poprzez ucieranie pałygorskitu z indygo w postaci proszku i ogrzewanie mieszaniny w temperaturze 120°C i 190°C , podkreślił rolę temperatury w procesie preparowania tego pigmentu sugerując, iż tylko ogrzewanie w 190°C prowadzi do produktów analogicznych do oryginalnych preparatów Błękitu Majów, odpornych na działanie kwasu azotowego. Ponadto wskazywał, że nieodwracalne połączenie indygo z pałygorskitem jest ściśle związane z ubytkiem wody zeolitowej w temperaturze $150\text{--}200^\circ\text{C}$. Nieudane próby otrzymania pigmentów w temperaturze 120°C , która była zbyt niska do usunięcia wody zeolitowej z kanałów miały dowodzić słuszność tych poglądów.

Liczne badania prowadzone przez innych naukowców potwierdzały możliwość swobodnej dyfuzji indygo w kanałach glin, po uprzednim usunięciu z ich przestrzeni wody zeolitowej i tworzenie wiązań wodorowych głównie przez grupy karbonylowe barwnika z wodą strukturalną matrycy [26, 34, 35, 62, 63].

Liczne dane literaturowe [22, 28, 49, 68–70] wskazują, że dominującą rolę w wiązaniu cząsteczek barwnika mają nie wiązania wodorowe, lecz koordynacyjne

połączenia z oktaedrycznymi kationami, tj. Al^{3+} lub Mg^{2+} . Brane jest również pod uwagę występowanie oddziaływań van der Waalsa między pałygorskitem a indygo [26, 71].

Analizując skład oryginalnych preparatów Błękitu Majów [72, 73] wykryto w nim fazy żelaza, tj. nanocząsteczki tlenku żelaza a także amorficzne fazy $\text{FeO}(\text{OH})$ zlokalizowane zarówno na zewnętrznej powierzchni, jak i w kanałach pałygorskitu. Autorzy sugerowali, iż ich obecność powoduje rozpraszanie światła, co ostatecznie wpływa na właściwości optyczne pigmentu, a także na jego charakterystyczny kolor. Powyższe poglądy były jednak w literaturze podważane [70].

Model struktury Błękitu Majów stanowiący organiczno-nieorganiczny kompleks zbudowany z pałygorskitu i indygo został przez Doménecha uzupełniony o nowy element, który sugeruje udział znaczących ilości utlenionej formy indygo – dehydroindygo w autentycznych próbkach Błękitu Majów. Zawierające w swojej strukturze pojedyncze centralne wiązanie C–C, dehydroindygo jest bardziej elastyczną cząsteczką niż indygo i zgodnie z prezentowanym poglądem, łatwiej dyfunduje w kanałach pałygorskitu i wykazuje większą podatność na tworzenie wiązań wodorowych, oddziaływań van der Waalsa i wiązań koordynacyjnych z oktaedrycznymi kationami. Różnorodność odcieni Błękitu Majów zależy od stosunku indygo do dehydroindygo zakotwiczonego w kanałach pałygorskitu, który może być kontrolowany przez zmianę temperatury preparowania pigmentów [38–40, 49, 74].

Najnowsze badania spektroskopowe (UV-vis, spektroskopia Ramana, FTIR, NMR) wskazują, że Błękit Majów jako wielofunkcyjny, hybrydowy materiał organiczno-nieorganiczny, w zależności od stosowanej temperatury obróbki termicznej może zawierać cząsteczki indygo i dehydroindygo okupujące różne pozycje w kanałach minerałów [44, 48, 75].

4. PIGMENTY Z MATRYCAMI SIT MOLEKULARNYCH

Sita molekularne [76] są uporządkowanymi, porowatymi materiałami o jednorodnym systemie porów, tworzących układy jedno-, dwu- lub trójwymiarowe. Wykazują one właściwości selektywnej adsorpcji cząsteczek uzależnione od ich wielkości i kształtu. Do rodziny sit molekularnych obecnie zaliczamy ogromną grupę materiałów o różnym składzie chemicznym, odmiennych właściwościach, charakterze szkieletu i geometrii, tj. np. zeolity, materiały zeolitopodobne, mezoporowate, a także metaloorganiczne (MOF). Glinokrzemianowe krystaliczne zeolity stanowią największą i najszerzej badaną grupę. Obecnie znanych jest około 200 typów struktur zeolitowych. Zgodnie z klasyfikacją proponowaną przez IUPAC [77] należą one do materiałów mikroporowatych (pory o rozmiarach ~0,3 do 2 nm). Do materiałów zeolitopodobnych należą materiały AlPO_4 i ich pochodne, a także metalokrzemiany, cynkofosforany, tytanosilikality i wiele innych [78, 79]. Materiały mezoporowate (najczęściej krzemionkowe) o amorficznych ścianach (np. MCM-41 [80] i SBA-15 [81]) zostały odkryte w 1992 roku [82]. Wykazują one uporządko-

wanie jednolitych mezoporów, jednak ściany kanałów są amorficzne. Gwałtowny postęp badań sit molekularnych doprowadził do odkrycia pod koniec lat 90-tych [83, 84] metaloorganicznych materiałów MOF (ang. *Metal Organic Framework* [85]), które zbudowane są z segmentów nieorganicznych (kationów metali) i ligandów organicznych, których wzajemne połączenie tworzy sieć krystaliczną o bardzo dużych powierzchniach właściwych [86, 87].

Sita molekularne ze względu na uporządkowaną porowatą strukturę, jednolity rozmiar i geometrię porów, elastyczność modyfikacji ich składu, a także wysoką odporność chemiczną i termiczną, są powszechnie stosowane jako adsorbenty, wymiennicze jonowe, rozdzielacze mieszanin czy katalizatory [88–93]. W ostatnich latach nastąpił dynamiczny wzrost zastosowania ich w roli matryc tzw. „gospodarzy” do lokowania w nich cząsteczek („gości”), w tym także chromoforów, w celu uzyskania nanomateriałów o nowych właściwościach np. optycznych, jakich nie posiadają „związki wyjściowe” i zastosowania ich w laserach, sensorach, półprzewodnikach materiałach fotochromowych, urządzeniach optoelektronicznych i pigmentach [94–98]. Enkapsulacja polega na trwałym zamknięciu cząsteczek „gości” we wnętrzu komór lub kanałów materiałów porowatych. Wprowadzone cząsteczki zwykle, nie wykazują silnego oddziaływania chemicznego z matrycą sit molekularnych. Mają rozmiar większy niż średnica otworów prowadzących do ich wnętrza, co uniemożliwia im opuszczenie porowatej matrycy, dlatego enkapsulacja obrazowo nazywana jest w literaturze „stateczek w butelce” (ang. *ship in the bottle*) [99, 100]. Enkapsulowane cząsteczki zmieniają swoje właściwości fizyczne i chemiczne, uzyskując np. wyjątkową trwałość, czego najpowszechniejszym przykładem jest naturalna ultramaryna, w której niestabilne rodniki siarkowe $\bullet S^3-$ trwale zamknięte w klatkach sodalitowych są przez nie skutecznie chronione [101]. Analogicznie poprzez enkapsulację w matrycach zeolitów wiele niestabilnych w roztworach jonów nieorganicznych (tiowęglany) [102] i organicznych łatwo ulegających degradacji (np. jon 2,4,6-trifenylopirylowy) zyskuje imponującą trwałość [103]. Ponadto wysoki stopień dyspersji, jaki osiągają uwięzione molekuly, w którym jedna cząsteczka okupuje jedną klatkę np. zeolitu, często wywołuje nowe właściwości, np. półprzewodnictwo czy luminescencję [104, 105].

Duże cząsteczki, takie jak kompleksy metali, mogą być enkapsulowane poprzez ich syntezę *in situ* w matrycach sit molekularnych z mniejszych sferycznie prekursorów. Obecność w matrycach sit molekularnych aktywnych katalitycznie miejsc aktywnych może być czynnikiem inicjującym zachodzące w nich reakcje. Metoda ta powszechnie stosowana była podczas enkapsulacji metaloftalocyjanin ($M = Fe, Co, Ni, Cu$). Uzyskane na drodze wymiany jonowej kationowe formy zeolitu Y, tj. CoY, FeY , traktowano mogącymi łatwo dyfundować w ich wnętrzu odpowiednimi ilościami dicyjanobenzenu (DCB), który oligomeryzował w podwyższonych temperaturach do metaloftalocyjanin tworzących połączenia kompleksowe z obecnymi kationami. Rozmiar powstających kompleksów znacząco przekraczał średnicę porów zeolitu Y [106–108].

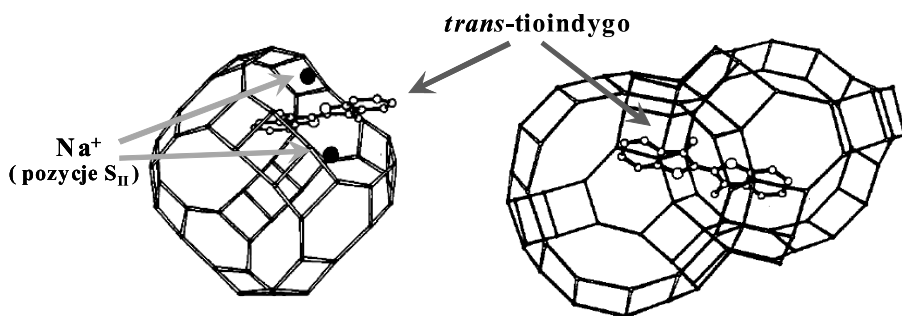
Wybrane związki mogą być także trwale zakotwiczone poprzez chemiczne wiązanie zaadsorbowanych cząsteczek z wewnętrzną powierzchnią (np. z kationami) sit molekularnych [95]. Geometria kanałów wymusza uporządkowaną lokalizację cząsteczek gości.

Zakotwiczenie wprowadzanych związków może być prowadzone już podczas syntezy sit molekularnych („budowanie butelki wokół stateczku”). Dodawanie metaloftalocyjanin (tj. Fe, Co, Ni, Cu) do mieszaniny przeznaczonej do krystalizacji fojazytu lub materiału $\text{AlPO}_4\text{-5}$ [109, 110], błękitu metylenowego podczas syntezy zeolitu NaY [111], chromoforów pirydyny [112], rodaminy B, rodaminy 3B i BE50 podczas syntezy materiału $\text{AlPO}_4\text{-5}$ [113] umożliwiło także ich trwale zamknięcie w strukturach wewnątrzkrystalicznych sit molekularnych. Obecność cząsteczek „gości” często wpływa jednak na kierunek krystalizacji i osiągnięcie poprawnej struktury krystalicznej matrycy jest niekiedy trudne, a ponadto pH żelu i podwyższona temperatura syntezy mogą powodować rozkład enkapsulowanych cząsteczek, co znacznie ogranicza możliwości stosowania tej metody zakotwiczenia.

Wprowadzenie organicznych barwników do matryc sit molekularnych często prezentowane w ostatnich latach w literaturze [100, 114, 115] pozwala uzyskać organiczno-nieorganiczne układy, w których zamknięte we wnętrzu cząsteczki najczęściej oddziałują z matrycą i uzyskują wysoki stopień samoorganizacji molekularnej, tworząc zaawansowane materiały o nowych właściwościach, jakich nie posiadają cząsteczki „gości” w roztworach [103]. Calzaferri [115, 116] uzyskał wiele interesujących materiałów poprzez zamknięcie kationowych, dwubiegunowych oraz neutralnych barwników w kanałach i klatkach zeolitu L. Zróżnicowany sposób ich ułożenia uzależniony jest od rozmiarów i kształtu uwięzionych cząsteczek. Otrzymane organiczno-nieorganiczne układy posiadały unikatowe właściwości, wykazując anizotropie optyczną czy zdolność do efektywnego przekazywania energii. Wiele innych rodzajów sit molekularnych wykorzystywano także do lokowania w ich wolnych przestrzeniach różnorodnych barwników, jak np. enkapsulacja błękitu metylenowego w zeolicie Y, kationowych (Na^+ , Ca^{2+}) i protonowej formie mordenitu, a także w materiałach $\text{AlPO}_4\text{-5}$, SAPO-5 i SAPO-34 [117–119], zieleni malachitowej w matrycach materiału mezoporowatego MCM-41 [120], barwnika laserowego – kumaryny 6 w materiale mezoporowatym MCM-48 [121], pyroniny B i Y w zeolicie L i fosforanie glinu $\text{AlPO}_4\text{-5}$ [122], rodaminy B w materiale MCM-41 i SBA-15 [123, 124] tioniny w fojazyście [125], proflawiny w zeolitach X, L i materiale mezoporowatym MCM-41 [126, 127], a także enkapsulacja czerwieni metylowej i oranżu metylowego w zeolicie NaY, HY, wysokokrzemowym zeolicie Y, ZSM-5 i mordenicie [128]. Wiele kationowych barwników organicznych, takich jak np. błękit metylenowy, pyronina, oksonina, tionina, proflawina [117–119, 126, 129], wprowadza się do matryc sit molekularnych (NaX, NaY, L) na drodze wymiany jonowej najczęściej z roztworów wodnych lub alkoholowych.

4.1. ANALOGI BŁĘKITU MAJÓW Z MATRYCAMI SIT MOLEKULARNYCH

W literaturze znajduje się zaledwie kilka doniesień dotyczących zastosowania sit molekularnych w roli matryc do enkapsulacji indygo bądź jego pochodnych, takich jak tioindygo, leukoindygo, indygokarmin. Schulz-Ekloff [114, 130] przedstawił pierwsze próby zastosowania zeolitów typu fojazytu do enkapsulacji tioindygo. Trwałe zamknięcie tioindygo zlokalizowanego w dwóch sąsiadujących superklatkach następowało podczas hydrotermalnej syntezy zeolitu z żelu zawierającego tioindygo bądź poprzez termiczną inkluzję barwnika podczas ogrzewania jego mieszaniny z zeolitem.



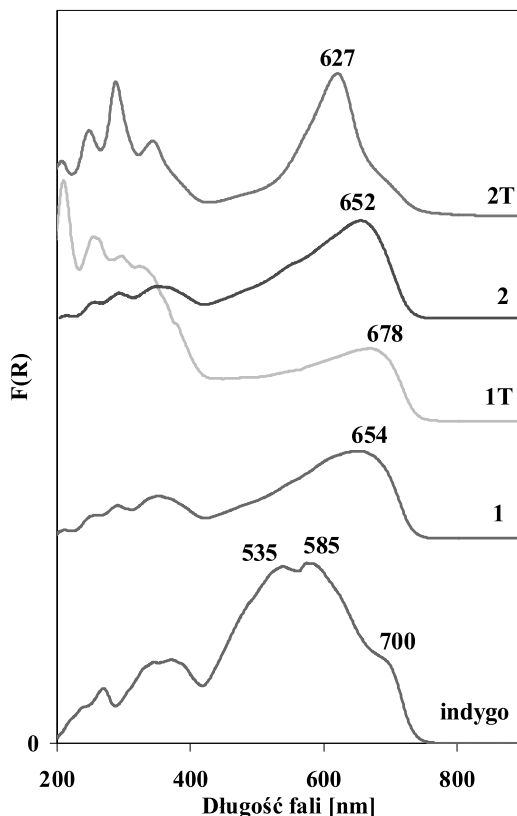
Rysunek 6. Lokalizacja cząsteczek tioindygo w klatkach fojazytu [130]

Figure 6. Location of thioindigo molecules in faujasite cages [130]

Grupa Schulza Ekloffa opatentowała metodę tworzenia wielu pigmentów (w tym indygowych) poprzez synteze zeolitów z mieszanin zawierających wybrane barwniki [131]. Skuteczne próby wprowadzania indygo podczas hydrotermalnej syntezy zeolitów (fojazyt, zeolit L), a także materiału zeolitopodobnego $AlPO_4-5$ z żeli zawierających dodatek barwnika w proszku były także prezentowane [132, 133]. Otrzymane barwne preparaty po oczyszczeniu z niezwiązanych cząsteczek barwnika, na drodze sublimacji w temperaturze ok. 340°C, utrzymywały swoje zabarwienie. Obecność indygooidów w mieszaninach krystalizacyjnych najczęściej nie wpływała na kierunek krystalizacji. Poprawną krystalograficznie strukturę potwierdzono za pomocą dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego XRD. Próby wprowadzenia tioindygo, leukoindygo i indygokarminy w matryce zarówno fojazytu, jak i zeolitu L były mniej owocne i otrzymywano głównie amorficzne produkty.

Zeolity, w porównaniu do glin włóknistych, stosowanych podczas preparowania analogów Błękitu Majów, dzięki ogromnej różnorodności struktur stwarzają szersze możliwości doboru odpowiedniego typu zeolitów, którego geometria porów najbardziej odpowiada rozmiarom wprowadzanych cząsteczek. Ponadto charakteryzują się one bardziej uporządkowaną strukturą, wolną od dodatkowych zanieczyszczeń występujących zwykle w minerałach. Bardzo ważną zaletą zeolitów jest łatwość ich modyfikacji (głównie przez wymianę kationów), co stwarza znacznie większe możliwości uzyskiwania różnorodnych pigmentów niż w przypadku tradycyjnych glin.

Kationy wprowadzone do zeolitów mogą zdecydowanie wpływać na zabarwienie i trwałość powstających pigmentów.

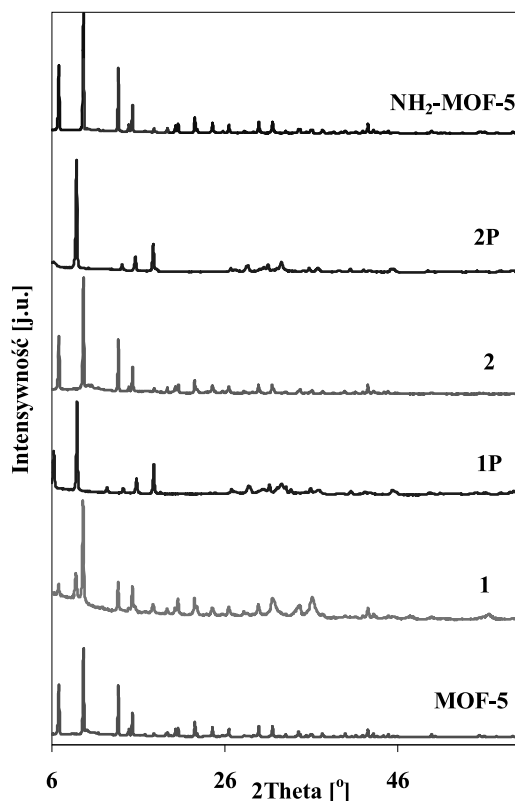


Rysunek 7. Widma UV-vis zeolitów NaX (1) i KL (2) utartych z indygo oraz poddane obróbce termalnej (T)
 Figure 7. UV-vis spectra of the zeolite NaX (1) and KL (2) samples grounded with indigo and after further thermal treatment (T)

Zaadaptowanie procedury analogicznej do tej, jaką prawdopodobnie stosowali Majowie polegającej na ucieraniu barwnika z nieorganiczną matrycą i ogrzewaniu otrzymanej mieszaniny w temperaturze powyżej 100°C umożliwiło termiczną inkluzję indygo do matrycy zeolitów typu fozajytu (0,7 nm), mordenitu (0,6 nm), zeolitu ZSM-5 (0,55 nm), beta (0,7 nm), zeolitu L (0,7 nm) [134, 135], których rozmiar otworów sorpcyjnych [136] zbliżony jest do rozmiaru cząsteczek indygo 0,48 nm × 1,2 nm [48]. Proces ucierania rozpoczyna prawdopodobnie już tworzenie połączeń chemicznych między organicznym barwnikiem, a nieorganiczną matrycą. Widma UV-vis (Rys. 7) otrzymanych preparatów znacznie różniły się od obrazu uzyskanego dla czystego indygo. Uwwięzienie granatowego barwnika w matrycach zeolitu A (0,4 nm) także było proponowane [137], jednakże prezentowane przez innych naukowców badania [132, 133, 138] nie potwierdzały możliwości zako-

twiczenia cząsteczek barwnika w mniejszych geometrycznie klatkach sodalitu i zeolitu A. Otrzymane preparaty traciły swoją barwę zarówno podczas sublimacji, jak i ekstrakcji roztworem nitrobenzenu lub dimetyloformamidu (DMF) w aparacie Soxhleta. Potwierdza to zdecydowanie nieskuteczność wiązania cząsteczek barwnika z zewnętrzną powierzchnią matrycy.

Możliwość tworzenia bezpośredniego wiązania koordynacyjnego między cząsteczkami barwnika a nieorganiczną matrycą było także badane z użyciem różnych kationowych form zeolitu X i L, tj. Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Zn^{2+} [139–141]. Ich obecność wpływała na barwę i trwałość otrzymanych pigmentów. Formy sodowe zeolitów po wprowadzeniu indygo wykazywały zdecydowanie najniższą intensywność barwy po usunięciu nadmiaru niezwiązanych cząsteczek barwnika, natomiast przy użyciu innych form kationowych pozostawały intensywnie zabarwione. Prezentowane badania jednoznacznie sugerują, że tworzenie wiązania koordynacyjnego z pozasieciowymi kationami zeolitowymi ma znaczący wpływ na charakter oddziaływania w organiczno-nieorganicznym kompleksie. Również naturalne zeolity, np. klinoptilolit, mordenit i ich kationowe modyfikacje mogą być zastosowane w celu otrzymania trwałych pigmentów indygowych [142]. Trwałe zakotwiczenie indygo i tioindygo w neutralnych matrycach materiału $AlPO_4-5$ okazało się również możliwe. Świadczy to o tym, że obecność kationów pozasieciowych, które nie występują w tych materiałach nie jest konieczna do związania cząsteczek barwnika. Niewykluczone, że są one związane koordynacyjnie z atomami szkieletowymi lub za pomocą wiązań wodorowych. Próby użycia matryc mezoporowatych (SBA-3, SBA-15) o znacznie większych średnicach porów niż rozmiary cząsteczek barwnika okazały się nieskuteczne i powstające produkty odbarwiały się podczas ekstrakcji rozpuszczalnikami. Jedynie w przypadku materiałów SBA-15 zawierającego pewien udział mikroporów, pewna ilość barwnika pozostawała w matrycy po przemywaniu, co wynikało z ich lokalizacji w mikroporach. Podjęto również próby zakotwiczenia cząsteczek barwnika w materiałach typu MOF stanowiących nową rodzinę sit molekularnych, tj. (MOF-5, NH_2 -MOF-5, ZIF-8, ZIF-90, M-53, M-101) [143]. Intensywność barwy otrzymanych materiałów była zdecydowanie niższa niż w zeolitowych analogach Błękitu Majów. Trwałe zakotwiczenie indygoiów nastąpiło jedynie w MOF-5 i NH_2 -MOF-5 o rozmiarze porów ok. 1,28 nm [144], natomiast w przypadku matrycy ZIF o strukturze sodalitu, gdzie wejście do komory wynosi 0,34 nm, a rozmiar komór 1,16 nm [145] produkty odbarwiały się podczas przemywania. Obecność grupy aminowej wpływała na barwę formowanych produktów. Otrzymane pigmenty cechowały się ograniczoną stabilnością i ich oczyszczenie powodowało zmiany strukturalne widoczne na dyfraktogramach XRD (Rys. 8).



Rysunek 8. Dyfraktogramy XRD materiału MOF-5(1) i NH₂-MOF-5 utartych i po obróbce termalnej z indygo, P- preparaty po przemyciu roztworem DMF-u

Figure 8. XRD patterns of MOF-5 (1) and NH₂-MOF-5 (2)grounded and thermally treated, P- indicates the final samples extracted with DMF.

PODSUMOWANIE

W ciągu ostatniego półwiecza ustalono w sposób jednoznaczny, że Błękit Majów jest hybrydowym układem zawierającym indygo uwięzione w matrycach nieorganicznych, głównie pałygorskitu. Domieszki w stosowanym mineralu (np. sepiolitu, także zanieczyszczeń różnymi kationami) wpływa na odcień uzyskanego pigmentu. Odtworzona procedura najprawdopodobniej stosowana przez cywilizacje przedkolumbijskie obejmuje ucieranie gliny z barwnikiem, a następnie ogrzewanie w temperaturze powyżej 100°C. Podczas ogrzewania indygo prawdopodobnie penetruje do wnętrza kanałów pałygorskitu i tworzy trwałe połączenia z jego powierzchnią, aczkolwiek w wielu publikacjach (szczególnie wcześniejszych) zakłada się, że cząsteczki barwnika zlokalizowane są na zewnętrznej powierzchni gliny. Trwałe wiązanie

przypisuje się wiązaniom koordynacyjnym z kationami matrycy, a także wiązaniom wodorowym, a nawet wiązaniom van der Waalsa.

Wbrew opiniom pionierów badań Błękitu Majów efektywnymi matrycami pigmentów indygowych okazały się zeolity o odpowiedniej geometrii porów (FAU, LTL, MOR, MFI). Wielką zaletą matryc zeolitowych jest możliwość łatwego wprowadzania do matryc zeolitowych dowolnych kationów, które wpływają na zabarwienie i trwałość otrzymanych produktów. Niewątpliwym wpływem kationów na właściwości pigmentów potwierdza decydującą rolę wiążącą barwnik z matrycą. Trwałe pigmenty powstają również przy użyciu bezkationowych matryc $AlPO_4-5$, co sugeruje inne oddziaływanie z matrycą.

Użycie krystalicznych mikroporowatych sit molekularnych jako matryc pigmentów analogicznych do Błękitu Majów może mieć istotne znaczenie praktyczne. Poza tym układy zeolitowe w sposób znacznie bardziej klarowny niż naturalne gliny pozwalają śledzić mechanizmy oddziaływania z cząsteczkami barwnika (w tym również jego pochodnych). Sita molekularne wyraźnie wskazują na lokalizację barwnika we wnętrzu przestrzeni sorpcyjnych i konieczność kompatybilności geometrycznej. Zbyt szerokie kanały materiałów mezoporowatych nie stabilizują pigmentu. Zeolity analogi Błękitu Majów mogą być otrzymywane przez krystalizację sit molekularnych z mieszanin zawierających barwnik, jednak metoda jest mniej skuteczna niż klasyczna inkluzja termiczna. Niektóre typy sit molekularnych MOF również trwale zakotwicząją barwniki indygowe i mogą być użyte jako matryce.

PODZIĘKOWANIA

Anna Zywert dziękuje za pomoc finansową w ramach grantu Nr NN 204 021 439, a Małgorzata Łukarska i Stanisław Kowalak w ramach grantu Nr NN 204 201 540.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] R.J. Gettens, *Am. Antiquity*, 1962, 7, 557.
- [2] R. Kleber, L. Masschelein-Kleiner, J. Thissen, *Stud. Conserv.*, 1967, 12, 41.
- [3] H. Van Olphen, *Sci.*, 1966, 154, 645.
- [4] M. Miller, S. Martin, *Courly Art. Of the Ancient Maya*, Thames & Hudson, London 2004.
- [5] M. José-Yacamán, L. Rendón, J. Arenas, M.C. Serra Puche, *Sci.*, 1996, 273, 223.
- [6] L. Polette, N. Ugarte, R. Chianelli, Presentation at the Workshop on Synchrotron Radiation in Art and Archaeology, SSRL, 2000.
- [7] R. Giustetto, K. Seenivasan, S. Bordiga, *Period. Mineral.*, 2010, 21.
- [8] <http://mexicocontrastado.blogspot.com/2011/05/arte-mexicano.html> – 8.05.2012 r.
- [9] L.M. Torres, *Mater. Res. Soc.*, 1988, 123, 123.
- [10] B. Hubbard, W. Kuang, A. Moser, G.A. Facey & C. Detellier, *Clay Clay Miner.*, 2003, 51, 318.
- [11] M. Sánchez Del Río, P. Martinetto, C. Reyes-Valerio, E. Dooryhée, M. Suarez, *Archaeometry*, 2006, 48, 115.

- [12] D.E. Arnold, *Ancient Mesoamerica*, 2005, **16**, 51.
- [13] J.M. Cabrera Garrido, *El 'Azul Maya'*, (Informes y Trabajos dei Instituto de Conservacion y Restauracion de Obras de Arte, Arqueologia y Etnologia 8), Madrid (1969).
- [14] A.M. Tozzer, *Chichén Itzá its Cenote of Sacrifice; a comperative Study of the Contemporaneous Maya and Toltec*, 1957.
- [15] B. Stross, *Antropology*, 2007, 393.
- [16] L.M. Vargas, *Los colores lacandones, la percepción visual de un pueblo maya*, Colección científica 372. INAH: México, 1998.
- [17] R. Kleber, L. Masschelein-Kleiner, J. Thissen, *Stud. Conserv.*, 1967, **12**, 41.
- [18] M.L. Vázquez de Ágredos Pascual, M.T. Doménech-Carbó, A. Doménech, *J. Cult. Herit.*, 2011, **12**, 140.
- [19] M.E. Haude, *J. Am. Int. Conserv.*, 1998, **37**, 240.
- [20] A.A. Tagle, H. Paschinger, H. Richard, G. Infante, *Stud. Conserv.*, 1990, **35**, 156.
- [21] H.E. Merwin, [w:] *Yucatan*, H.E. Morris, J. Charlot, A.A. Morris (Eds.), *Temple Warriors at Chitzen Itza*, 406, Carnegie Institution of Washington, DC, 1931, 356.
- [22] F.S. Manciu, A. Ramirez, W. Durrer, J. Govani, R.R. Chianelli, *J. Raman Spectroscop.*, 2008, **39**, 1257.
- [23] E. Littmann, *Am. Antiquity*, 1980, **45**, 87.
- [24] R.J. Gettens, G.L. Stout, *Painting Materials, a Short Encyclopaedia*, D. Van Nostrand New York, 1942, str. 130.
- [25] L.A. Polette, G. Meitzner, M.J. Yacaman, R.R. Chianelli, *Microchem. J.*, 2002, **71**, 167.
- [26] E. Fois, A. Gamba, A. Tilocca, *Micropor. Mesopor. Mat.*, 2003, **57**, 263.
- [27] M. Suárez Barrios, L.V. Flores González, M.A. Vicente Rodríguez, J.M. Martin Pozas, *App. Clay Science*, 1995, **10**, 247.
- [28] S. Ovarlez, F. Giulieri, A. Chaze, F. Delamare, J. Raya, J. Hirschingier, *Chem. E. J.*, 2009, **15**, 11326.
- [29] P. Gómez-Romero, C. Sanchez, *Functional Hybrid Materials*, Wiley-Vch, 2004.
- [30] A. Spherad, *Am. Antiquity*, 1962, **27**, 565.
- [31] A.O. Shepard, H.B. Gottlieb, *Maya blue: Alternative hypothesis* [w:] *In Notes from a ceramic laboratory I*. Washington D. C.: Carnegie Institution of Washington, 1962.
- [32] D. Arnold, B. Bohor, *Arch.*, 1975, **28**, 23.
- [33] M.E. Fernández, J.A. Ascencio, D. Mendoza-Anaya, V.R. Lugo, M. José-Yacamán, *J. Mat. Science*, 1999, **34**, (21), 5243.
- [34] G. Chiari, R. Giustetto, G. Ricciardi, *Eur. J. Mineral.*, 2003, **15**, 21.
- [35] M. Sánchez del Río, P. Martinetto, A. Somogyi, C. Reyes-Valerio, E. Dooryhée, N. Peltier, L. Alianelli, B. Moignard, L. Pichon, T. Calligaro, J.C. Dran, *Spectrochim. Acta B*, 2004, **59**, 1619
- [36] M. Sánchez del Río, P. Martinetto, A. Somogyi, C. Reyes-Valerio, E. Dooryhée, N. Peltier, L. Alianelli, B. Moignard, L. Pichon, T. Calligaro, J. Dran, *Spectrochim. Acta B*, 2004, **59**, 1619.
- [37] D. Reinen, P. Köhl, C. Müller C, *Zeitsch Anorg. Allgem. Chem.*, 2004, **630**, 97.
- [38] A. Doménech, M.T. Doménech-Carbó, M.L. Vázquez de Agredos Pascual, *J. Phys. Chem. B*, 2006, **110**, 6027.
- [39] A. Doménech, M.T. Doménech-Carbó, M.L. Vázquez de Agredos Pascual, *J. Phys. Chem. C*, 2007, **111**, 4585.
- [40] A. Doménech, M.T. Doménech-Carbó, M.L. Vázquez de Agredos Pascual, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 2812.
- [41] J. Balfour-Paul, *Indigo*, British Museum Press, London, 2000.
- [42] D. Cardon, *Natural dyes, Sources, tradition, technology and science*, Archetype publications, London, 2007.

- [43] M.M. Sousa, C. Miguel, I. Rodrigues, A.J. Parola, F. Pina, J. Sérgio Seixas de Melo, M.J. Melo, *Photoch. Photobio. Sci.*, 2008, **7**, 1353.
- [44] A. Doménech, M.T. Doménech-Carbó, M. Sánchez del Río, M.L. Vázquez de Agredos Pascual, E. Lima, *New J. Chem.*, 2009, **33**, 2371.
- [45] J.B. Harry, *The Woad Plant and its Dye*, Oxford Univ. Press, Oxford 1930.
- [46] J.S. Turski, *Barwniki kadziowe. Indygo i Indygoidy*, Państwowe Wydawnictwo Techniczne, Warszawa 1953, str. 16.
- [47] C.D. Nenitescu, *Chemia organiczna*, Tom II, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 1969, str. 618.
- [48] A. Doménech, M. Doménech-Carbó, M. Sánchez del Río, S. Goberna, E., Lima, *J. Phys. Chem. C*, 2009, **113**, 12118.
- [49] A. Tilocca, E. Fois, *J. Phys. Chem. C*, 2009, **113**, 8683.
- [50] A. Baeyer, A. Emmerling, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 1869, **2**, 679.
- [51] R.J.H. Clark, C.J. Cooksey, M.A.M. Daniels, R. Withnall, *Endeavour* 1993, **17**, 191.
- [52] P. Vandenberghe, L. Moens, *The Analyst*, 2003, **128**, 187.
- [53] <http://pl.wikipedia.org/wiki/Indygo>.
- [54] A.M. Bond, F. Marken, E. Hill, R.G. Compton, H. Hugel, *J. Chem. Soc.*, 1997, **2**, 1735.
- [55] P. Romero, C. Sanchez, *New J. Chem.*, 2005, **29**, 57.
- [56] H.L. DuPont, D.D. Ericsson, M.W. DuPont, A.C. Luna, J.J. Mathewson, *Am. J. M.* 88 (Supplement 6A): 20S-23S.
- [57] S. Overlaz, F. Giulieri, F. Delamare, N. Sbirrazzuoli, A.M. Chaze, *Micropor. Mesopor. Mat.*, 2011, **142**, 371.
- [58] J. Chisholm, *The Canadian Mineralogist*, 1990, **28**, 329.
- [59] J. Chisholm, *The Canadian Mineralogist*, 1992, **30**, 61.
- [60] G.A. Facey, W. Kuang, C. Detellier, *J. Phys. Chem. B*, 2005, **109**, 22359.
- [61] M. Sánchez del Río, E. Boccaleri, M. Milanesio, G. Croce, W. van Beek, C. Tsiantos, G. Chyssikos, V. Gionis, G. Kacandes, M. Suárez, *J. Mater. Sci.*, 2009, **44**, 5524.
- [62] R. Giustetto, K. Seenivasan, S. Bordiga, *Periodico di Mineralogia, An International Journal of mineralogy, crystallography, geochemistry, ore deposits, petrology, volcanology and applied topics on Environment, Archeometry and Cultural Heritage, Scienze e Lettere*, (2010), 21.
- [63] R. Giustetto, F. Llabrés i Xamena, G. Ricchiardi, S. Bordiga, A. Damin, R. Gobetto, M. Chierotti, *J. Phys. Chem. B*, 2005, **109**, 19360.
- [64] M. Sánchez del Río, P. Martinetto, C. Reyes-Ralerio, R. Dooryhée, M. Suárez, *Archaeometry*, 2006, **48**, 115.
- [65] N. Yasarawan, J. Duijneveldt, *Langmuir*, 2008, **24**, 7184.
- [66] G. Chiari, R. Giustetto, J. Druzik, E. Doehne, G. Ricchiardi, *Appl. Phys. A*, 2008, **90**, 3.
- [67] G. Chiari, R. Giustetto, *Acta Crystallogr. A*, 2005, **A61**, C77.
- [68] L. Polette-Niewold, F. Manciu, B. Torres, M. Alvarado Jr, R. Chianelli, *J. Inorg. Biochem.*, 2007, **101**, 1958.
- [69] M.E. Fuentes, B. Peña, C. Contreras, A. Montero, R. Chianelli, M. Alvarado, R. Olivas, L. Rodríguez, H. Camacho, L. Montero-Cabrera, *Int. J. Quantum Chem.*, 2008, **108**, 1664.
- [70] S. Ovarlez, A. Chaze, F. Giulieri, F. Delamare, *Compt. Rend. Chimie*, 2006, **10**, 1243.
- [71] A. Doménech, M. Teresa Doménech-Carbó, M. Luisa Vázquez de Agredos Pascual, *J. Phys. Chem. C*, 2007, **111**, 4585.
- [72] M. José-Yacamán, L. Rendón, J. Arenas, M.C. Serra Puche, *Science*, 1996, **273**, 223.
- [73] A. Polette, G. Meitzner, M. José-Yacamán, R. Chianelli, *Microchem. J.*, 2002, **71**, 167.
- [74] A. Doménech, M. Teresa Doménech-Carbó, M. Vázquez De Agredos Pascual *Archaeometry*, 2009, **51**, 1015.

- [75] A. Doménech, M. Doménech-Carbó, M. Sánchez del Río, M. Vázquez de Agredos Pascual, *J. Solid State Electr.*, 2009, **12**, 869.
- [76] J. McBain, *The Sorption of Gases and Vapours by Solids*, Routledge & Sons, London, 1932, str. 371.
- [77] A. Corma, *Chem. Rev.*, 1997, **97**, 2373.
- [78] E.M. Flanigen, B.M. Lok, R.L. Patton, *Proceedings of the 7th International Zeolite Conference*, Y. Murakami, A. Iijima, J. Ward (Ed.), Kodansha, Tokyo, Japan, 1986.
- [79] S.T. Wilson, B.M. Lok, C.A. Messina, T.R. Cannan, E.M. Falnigen, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 1982, 1146.
- [80] J. Beck, J. Vartuli, W. Roth, M. Leonowicz, C. Kresge, K. Schmitt, C. Chu, D. Olson, E. Sheppard, S. McCullen, J. Higgins, J. Schlenker, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 10834.
- [81] D. Zhao, Q. Huo, J. Feng, B.F. Chmelka, G.D. Stucky, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 6024.
- [82] C. Kresge, M. Leonowicz, W. Roth, J. Vartuli, J. Beck, *Nature*, 1992, **359**, 710.
- [83] M.J. Zaworotko, S. Subramanian, *Angew. Chem. Int. Edit.*, 1995, **34**, 2127.
- [84] O.M. Yaghi, H. Li, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 10401.
- [85] H. Li, M. Eddaoudi, M. O'Keeffe, O.M. Yaghi, *Nature*, 1999, **402**, 276.
- [86] O.M. Yaghi, M. O'Keeffe, N.W. Ockwig, H.K. Chae, M. Eddaoudi and J. Kim, *Nature*, 2003, **423**, 705.
- [87] S. Kowalak, P. Florczak, K. Kędzierska, E. Janiszewska, *Wiad. Chem.*, 2011, **65**, 427.
- [88] C. Martinez, A. Corma, *Coordin. Chem. Rev.*, 2011, **255**, 1558.
- [89] C. Rhodes, *Annu. Rep. Prog. Chem. Sect. C*, 2007, **103**, 287.
- [90] S. Meisel, J. McCulloch, C. Lechthaler, P. Weisz, *Chem. Tech.*, 1976, **6**, 86.
- [91] A. Galarneau, F. Di Renzo, F. Fajula, J. Vedrine, *Stud. Surf. Sci. Catal.*, 2001, **135**, 13.
- [92] J. Sherman, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999, **96**, 3471.
- [93] C. Rhodes, *Progr. React. Kinet. Mech.*, 2005, **30**, 145.
- [94] G. Schultz-Ekloff, *Stud. Surf. Sci. Catal.*, 1994, **85**, 145.
- [95] D. Brühwiler, G. Calzaferri, *Micropor. Mesopor. Mater.*, 2004, **72**, 1.
- [96] T. Bein, S. Mintova, *Stud. Surf. Sci. Catal.*, 2005, **157**, 263.
- [97] F. Laeri, F.Schüth, U. Simon, M. Wark, *Host-Guest Systems based on Nanoporous Crystals*, Wiley-VCH, Weinheim, (2003).
- [98] S. Kowalak, A. Jankowska, *Inorganic Sulphur Piments Based on Nanopored Materials in Ordered Porous Solids*, Valtchev, V., Mintova, S., Tsapatsis, M. (Eds.), Elsevier New York 2009, str. 591.
- [99] N. Herron, *Inorg. Chem.*, 1986, **25**, 4714.
- [100] A. Corma A.H. Garcia, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2004, **6**, 1143.
- [101] E. Del Federico, W. Shöfberger, J. Schelvis, S. Kapetanaki, L. Tyne, A. Jerschow, *Inorg. Chem.*, 2006, **45**, 1270.
- [102] S. Kowalak, A. Jankowska, A. Zywert, A. Werbińska, *Topics in Chemistry and Material Science*, Vol. 4; *Advanced Micro- and Mesoporous Materials – 09'*, Heron Press, 2010, 106.
- [103] J.C. Scaiano, H. García, *Acc. Chem. Res.*, 1999, **32**, 173.
- [104] T. Bein, *Inclusion Chemistry of Organometallics in Zeolite. Comprehensive Supramolecular Chemistry*, J.L. Atwood, J.E.D. Davies, D.D. Macnicol, R. Vögtle (Eds.), 1996, **7**, 579.
- [105] N. Herron, *J. Incl. Phenom. Mol. Rec. Chem.*, 1995, **21**, 283.
- [106] S. Ray, S. Vasudevan, *Inorg. Chem.*, 2003, **42**, 1711.
- [107] K.J. Balkus Jr., A.K. Khanmamedova, K.M. Dixon, F. Bedioui, *Appl. Catal. A*, 1996, **143**, 159.
- [108] J. He, Y. Ba, C.I. Ratcliffe, J.A. Ripmeester, D.D. Klug, J.S. Tse, K.F. Preston, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 10697.
- [109] K.J. Balkus, S. Kowalak, K.T. Ly, D.C. Hargis, *Stud. Surf. Sci. Catal.*, 1991, **69**, 93.
- [110] S. Kowalak, K.J. Balkus, Jr, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 1992, **57**, 774.

- [111] R. Hoppe, G. Schulz-Ekloff, D. Wöhrle, M. Ehrl, C. Bräuchle, *Stud. Surf. Sci. Catal.*, 1991, **69**, 199.
- [112] G. Ihlein, F. Schüth, O. Krauß, U. Vietze, F. Laeri, *Adv. Mater.*, 1998, **10**, 1117.
- [113] M. Bockstette, D. Wöhrle, I. Braun, G. Schulz-Ekloff, *Micropor. Mesopor. Mater.*, 1998, **23**, 83.
- [114] G. Schulz-Ekloff, Dieter Wöhrle, B. Duffel, R. Schoonheydt, *Micropor. Mesopor. Mater.*, 2002, **51**, 91.
- [115] D. Brühwiler, G. Calzaferri, T. Torres, J. Ramm, N. Gartmann, L. Q. Dieu, I. López-Duarte, M. Victoria Martínez-Díaz, *J. Mater. Chem.*, 2009, **19**, 8040.
- [116] D. Brühwiler, G. Calzaferri, *Micropor. Mesopor. Mater.*, 2004, **72**, 1.
- [117] R. Hoppe, G. Schulz-Ekloff, D. Wöhrle, C. Kirschhock, H. Fuess, L. Uytterhoeven, R. Schoonheydt, *Adv. Mater.*, 1995, **7**, 61.
- [118] R. Hoppe, G. Schulz-Ekloff, D. Wöhrle, E. Shpiro, O. Tkachenko, *Zeolites*, 1993, **13**, 222.
- [119] M. Zanjanchi, S. Sohrabnejad, *J. Incl. Phenom. Macro. Chem.*, 2003, **46**, 43.
- [120] X.-D. Li, Q.-Z. Zhai, M.-Q. Zou, *Appl. Surf. Sci.*, 2010, **257**, 1134.
- [121] D. Li, J. Zhang, M. Anpo, M. Xue, Y. Liu, *Mater. Lett.*, 2005, **59**, 2120.
- [122] H. Lim, H. Cheong, *J. Kor. Phys. Soc.*, 2011, **58**, 1035.
- [123] L. Yue-Xiang, Z. Qing-Zhou, *Bull. Chem. Soc. Ethiop.*, 2009, **23**, 145.
- [124] Q.Z. Zai, D. Yang, *Asian J. Chem.*, 2009, **21**, 2198.
- [125] F. Deeg, M. Ehrl, C. Bräuchle, R. Hoppe, G. Schulz-Ekloff, D. Wöhrle, *J. Lumin.*, 1992, **53**, 219.
- [126] K. Ananthanarayanan, C. Selvaraju, P. Natarajan, *Micropor. Mesopor. Mater.*, 2007, **99**, 319.
- [127] V. Ganesan, R. Ramaraj, *J. Lumin.*, 2001, **92**, 167.
- [128] K. Huddersman, V. Patrino, G. Blake, R. Dahm, *J. Soc. Dyers Colour.*, 1998, **114**, 155.
- [129] N. Gfeller, S. Megelski, G. Calzaferri, *J. Phys. Chem. B*, 1999, **103**, 1250.
- [130] R. Hoppe, G. Schulz-Ekloff, D. Wöhrle, C. Kirschhock, H. Fuess, *Langmuir*, 1994, **10**, 1517.
- [131] R. Hoppe, G. Schulz-Ekloff, D. Wöhrle, Patent Niemiecki, DE 41 26 461 C2 (1994).
- [132] S. Kowalak, A. Zywert, M. Łukarska, 5th International FEZA Conference, Valencia, Hiszpania, 2011.
- [133] S. Kowalak, A. Zywert, 3rd International Symposium on Advanced Micro- and Mesoporous Materials, Albena, Bułgaria, 2009.
- [134] S. Kowalak, A. Jankowska, A. Zywert, P. Florczak, E. Janiszewska, Proceedings of 4th International Symposium Advanced Micro- and Mesoporous Materials, Riviera resort, Bułgaria, w druku.
- [135] C. Dejoie, P. Martinetto, E. Dooryhée, P. Strobel, S. Blanc, P. Bordat, R. Brown, F. Porcher, M. Sanchez Del Rio, M. Anne, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2010, **2**, 2308.
- [136] C. Baerlocher, W.M. Meier, D. Olson, *Atlas of Zeolite Framework Types*, Elsevier, 2001.
- [137] C. Dejoie, P. Martinetto, E. Dooryhée, E. Van Elslande, S. Blanc, P. Bordat, R. Brown, F. Porcher, M. Anne, *Appl. Spectrosc.*, 2010, **64**, 1131.
- [138] S. Kowalak, A. Jankowska, A. Zywert, *Pigments with Molecular Sieves Matrices; Special Issue of Current Physical Chemistry – Advanced Characterization of Porous Materials*, 2011; w druku.
- [139] S. Kowalak, A. Zywert, V. Padilla López, *Zeolite pigments with entrapped thioindigo; Monographic studies in molecular sieves: synthesis, characterization and applications*, Vol. 1, *Zeolites and other molecular sieves: New trends in synthesis, modification and applications*; Polish Zeolite Association Poznań (2010), 101.
- [140] S. Kowalak, A. Zywert, G. Cruciani, 16th International Zeolite Conference joint with 7th International Mesostructured Materials Symposium, Sorrento, Włochy, 2010.
- [141] S. Kowalak, A. Zywert, M. Łukarska, 23rd German Zeolite Conference (Deutsche-Zeolith-Ta-gung), Erlangen, Niemcy, 2011.
- [142] S. Kowalak, A. Zywert, *Clay Miner.*, 2011, **46**, 197.

-
- [143] S. Kowalak, A. Zywert, M. Łukarska, P. Florczak, E. Janiszewska, Materiały pokonferencyjne XVIII Forum Zeolitowe, Mañe Ciche, 2011.
- [144] H. Li, M. Eddaouñdi, M. O' Keeffe, O. M. Yaghi, *Nature*, 1999, **402**, 276.
- [145] A. Phan, Ch. J. Doonan, F.J. Uribe- Romo, C.B. Knobler, M. O' Keeffe, O.M. Yaghi, *Acc. Chem. Res.*, 2010, **43**, 58.

Praca wpłynęła do Redakcji 11 maja 2012

BIBLIOTEKI ZWIĄZKÓW CHEMICZNYCH
LIBRARIES OF CHEMICAL COMPOUNDS

Krzysztof M. Zwoliński, Zbigniew J. Leśnikowski

*Pracownia Wirusologii Molekularnej i Chemii Biologicznej,
Instytut Biologii Medycznej PAN
ul. Lodowa 106, 93-232 Łódź
e-mail: kzwolinski@cbm.pan.pl, zlesnikowski@cbm.pan.pl*

Abstract

Wprowadzenie

1. Eksploracja zasobów przestrzeni chemicznej – biblioteki wirtualne
2. Infrastruktura eksperymentalnych bibliotek związków
3. Projektowanie struktury i właściwości bibliotek
4. Normalizacja i profilowanie właściwości bibliotek metodami *in silico*
5. Biblioteki generyczne
6. Biblioteki fragmentów
7. Biblioteki związków naturalnych

Piśmiennictwo cytowane



Dr Krzysztof M. Zwoliński jest absolwentem Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Po ukończeniu studiów i uzyskaniu stopnia doktorskiego w 2011 r. rozpoczął pracę w Instytucie Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi. Obecnie uczestniczy w realizacji Europejskiego projektu otwartych platform screeningowych w chemii biologicznej: EU-OPENSREEN.

Swoje zainteresowania naukowe związane z chemią medyczną i bionanotechnologią rozwija w Pracowni Wirusologii Molekularnej i Chemii Biologicznej IBM PAN kierowanej przez profesora Zbigniewa J. Leśnikowskiego.



Prof. dr hab. Zbigniew J. Leśnikowski jest absolwentem Wydziału Chemii Politechniki Łódzkiej. W latach 1974–1994 związany był z Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN gdzie uzyskał stopień doktora i doktora habilitowanego, w roku 2004 uzyskał tytuł profesora zwyczajnego. W latach 1992–1996 pracował w Uniwersytecie Emory i Veterans Affairs Medical Center w Atlancie, USA. Od roku 1996 pracuje w Instytucie Biologii Medycznej PAN w Łodzi gdzie od roku 2009 pełni funkcję dyrektora. Przedmiotem zainteresowań prof. Leśnikowskiego jest chemia kwasów nukleinowych

i ich komponentów. Synteza, badania właściwości fizykochemicznych i biologicznych modyfikowanych nukleozydów, nukleotydów i DNA/RNA-oligonukleotydów zawierających klastery boru, modyfikowane kwasy nukleinowe jako materiały dla bionanotechnologii, bioterapeutyki i sondy molekularne w diagnostyce medycznej. Badania koniugatów nukleozydów i klastrów boru jako modulatorów aktywności receptorów purynergicznycch i nośniki boru dla BNCT, poszukiwania nowych związków o aktywnościach przeciw wirusowych.

ABSTRACT

Over the past decade one can observe a scientific revolution taking place resulting in an explosion of new biotechnologies. Moreover, with the end of the human genome project and following expansion of the extensive genetic research an unprecedented number of new biological targets useful in drug design have been identified. Simultaneously, new methods such as combinatorial synthesis have expanded the overall size of chemical libraries and high-throughput technologies have enabled to screen more than one million compounds a day [43]. However, an increasing size of chemical libraries in a random fashion may not necessary increase a probability of success and the overall number of successfully identified leads. Thus, success of any drug discovery program depend heavily on the assumed selection criteria of appropriate molecules [58] which properties should maximize the chances of identifying ligands for any given target. Selection criteria used for compounds to generate diverse as well as focused chemical libraries are briefly discussed in the present overview. We describe the most important quality factors such as size, diversity and chemical tractability which should be always kept in mind during the design of chemical libraries.

Chemical space is enormous and limited only by a chemist's imagination. The number of possible drug-like molecules within chemical space has been estimated to be around 10^{60} [17]. In contrast the overall number of atoms in the observable Universe is approximately 10^{80} . It is obvious that it is impossible to synthesize every possible molecule so one need to explore only those regions of chemical space which are enriched with molecules of appropriate structure and function. Recent strategies for the design of high-quality collections of structurally diverse sets of small molecules are discussed in the context of probing the chemical space in order to find new biologically active structures.

Keywords: chemical libraries, virtual libraries, chemical space, drug, natural products

Słowa kluczowe: biblioteki chemiczne, biblioteki wirtualne, przestrzeń chemiczna, lek, związki naturalne

WPROWADZENIE

Biblioteką związków nazywa się uporządkowany zbiór cząsteczek chemicznych o poznanej strukturze oraz właściwościach fizykochemicznych, stworzony z zamiarem usprawnienia procesu identyfikacji substancji spełniających założone kryteria, a przy tym wykazujących spodziewaną aktywność. Wyjątkiem są tutaj biblioteki ekstraktów pozyskiwanych ze źródeł naturalnych, które zawierają wcześniej niezidentyfikowane metabolity wtórne (ang. *secondary metabolites*). Ze względu na szczególny charakter bibliotek ekstraktów, dokładną analizę jakościową zdeponowanych próbek przeprowadza się dopiero po stwierdzeniu w badaniach przesiewowych obecności substancji aktywnej (ang. *hit*).

Biblioteki związków chemicznych dzielą się na dwie zasadnicze grupy: biblioteki wirtualne oraz biblioteki eksperymentalne [1]. Biblioteki eksperymentalne składają się z próbek istniejących w rzeczywistości związków, których aktywność testuje się doświadczalnie przy wykorzystaniu wysokowydajnych metod eksperymentalnych (ang. „*wet screening*”) [2].

Z kolei biblioteki wirtualne zawierają jedynie zakodowane w odpowiednim formacie danych reprezentacje możliwych do wyprowadzenia z danego składu elementarnego struktur, których aktywność testuje się w środowisku wirtualnym z wykorzystaniem metod obliczeniowych, w tym popularnych obecnie metod modelowania molekularnego [3].

Biblioteki chemiczne wykorzystuje się powszechnie w wielu dyscyplinach nauki poszukując związków aktywnych biologicznie dla przemysłu farmaceutycznego, weterynarii, rolnictwa, biotechnologii, kosmetologii czy też dodatków do żywności. W niniejszym opracowaniu ograniczamy się do bibliotek dedykowanych poszukiwaniu nowych leków.

Wielkość bibliotek substancji o potencjalnej aktywności biologicznej może zmieniać się w bardzo szerokim zakresie począwszy od niewielkiego zbioru kilkuset wyselekcjonowanych związków a skończywszy na kolekcjach zawierających kilka milionów i więcej połączeń.

W zależności od przeznaczenia w skład bibliotek eksperymentalnych mogą wchodzić związki niskocząsteczkowe (ang. *small molecules*) [4], których masa cząsteczkowa nie przekracza umownej granicy 700 Da, jak również polimery [5], przeciwciężła [6], peptydy [7], białka [8], oligonukleotydy [9] oraz kwasy nukleinowe [10]. Obecnie znanych jest także wiele przypadków kompleksów metali przejściowych o udowodnionej aktywności biologicznej [11], które znalazły zastosowanie, jako leki antynowotworowe [12], przeciwwzapalne [13] czy też leki stosowane w stanach zaawansowanej cukrzycy [14].

1. EKSPLOACJA ZASÓBOW PRZESTRZENI CHEMICZNEJ – BIBLIOTEKI WIRTUALNE

Na początku 2012 r. w największej na świecie naukowej bazie danych chemicznych Chemical Abstract Service (CAS) odnotowano rekordową liczbę ponad 63 milionów zarejestrowanych związków chemicznych [15]. Tymczasem liczbę wszystkich możliwych cząsteczek organicznych szacuje się w zależności od przyjętego algorytmu [16] na około 10^{18} – 10^{180} z czego przynajmniej 10^{60} cząsteczek może stanowić potencjalne modulatory celów biologicznych [17], a obecny stan zaawansowania technologii pozwala na syntezę blisko 10^{20} – 10^{24} cząsteczek [18]. Jeżeli odnieść te dane do liczby atomów w obserwowalnym wszechświecie, którą szacuje się na około 10^{80} atomów, wówczas stanie się zrozumiałym, iż nie jest możliwa nie tylko synteza, ale nawet wyczerpująca analiza zasobów całej przestrzeni chemicznej. Wkrótce może okazać się, iż wielkość dostępnych zasobów przestrzeni chemicznej ogranicza już tylko wyobraźnia ludzkiego umysłu, dlatego coraz większą uwagę przywiązuje się nie tyle do samej eksploracji zasobów, co do poszukiwań obszarów bogatych w związki aktywne w stosunku do danego celu biologicznego.

Przykładowa baza wirtualnych cząsteczek (ang. *generated database*) GDB-10 stworzona przez Reymonda i współpracowników [19] celem przeprowadzenia wirtualnych badań przesiewowych zawiera aż 26,4 milionów unikalnych reprezentacji struktur, z których udaje się wygenerować 110,9 miliona stereoisomerów. Wirtualną bazę GDB-10 tworzą reprezentacje cząsteczek o średniej masie cząsteczkowej 153,2 Da, z czego aż 87% to reprezentacje cząsteczek o masie poniżej 160 Da spełniające kryterium lekopodobności (ang. *druglikeness*) [20].

Przydatność bazy GDB-10 zademonstrowano w kampanii poszukiwania nowych kandydatów na substancje wiodące dla modulatorów wybranych klas receptorów i enzymów. Wykorzystując pakiet obliczeniowy oparty na statystyce Bayesowskiej [21] w bazie GDB-10 udało się znaleźć blisko 17,106 modulatorów receptorów sprzężonych z białkiem G, 2,071 inhibitorów kinaz oraz 7,527 ligandów regulujących aktywność kanałów jonowych.

Warto zwrócić uwagę na fakt, iż całkowita liczba cząsteczek zawartych w wirtualnych bazach GDB jest funkcją liczby atomów tworzących cząsteczkę. I tak wirtualne bazy GDB-13 [22] oraz GDB-15 [23] zawierają odpowiednio 980 milionów i 28,8 biliona reprezentacji trwałych w temperaturze pokojowej cząsteczek zawierających odpowiednio poniżej 13 oraz 15 atomów. W drodze ekstrapolacji łatwo oszacować, iż dla cząsteczek złożonych z 25 atomów powinno istnieć już ok. 10^{27} możliwych kombinacji. Ponieważ nie jest możliwa nawet zadowalająca eksploracja a co dopiero wyczerpująca synteza astronomicznych zasobów chemicznego wszechświata, dlatego pozostaje nam opracować skuteczne narzędzia do nawigacji w obszarach bogatych w cząsteczki o pożądaną aktywność.

Jak zauważa Lipiński i Hopkins przestrzeń chemiczna w wielu aspektach przypomina naturę kosmologicznego wszechświata, który podobnie zresztą jak wirtualny wszechświat cząsteczek „odznacza się podobną strukturą oraz bezmiarem”

[24]. Cząsteczki aktywne wobec określonej klasy celów biologicznych wykazują tendencję do grupowania się w specyficznych obszarach przestrzeni chemicznej przypominających galaktyki [25]. Co więcej przestrzeń chemiczną można również rozpatrywać w kontekście wielowymiarowej przestrzeni wszystkich deskryptorów [26], wyrażających w sposób liczbowy cechy strukturalne.

Przez pojęcie deskryptora należy rozumieć „wynik operacji logicznej lub matematycznej, która przekształca informację chemiczną kodowaną w symbolicznej reprezentacji cząsteczki w jej postać numeryczną” [27].

Skuteczna nawigacja w całym obszarze przestrzeni chemicznej wymaga, więc odwzorowania reprezentacji wszystkich znanych cząsteczek na współrzędnych wielowymiarowej przestrzeni deskryptorów [28]. Jednocześnie każdy wymiar powinien wyrażać unikalne cechy strukturalne wyrażone przez właściwości fizykochemiczne, molekularne odciski palca (ang. *molecular fingerprints*), cechy topologiczne, czy też podobieństwo do wybranego związku odniesienia [29].

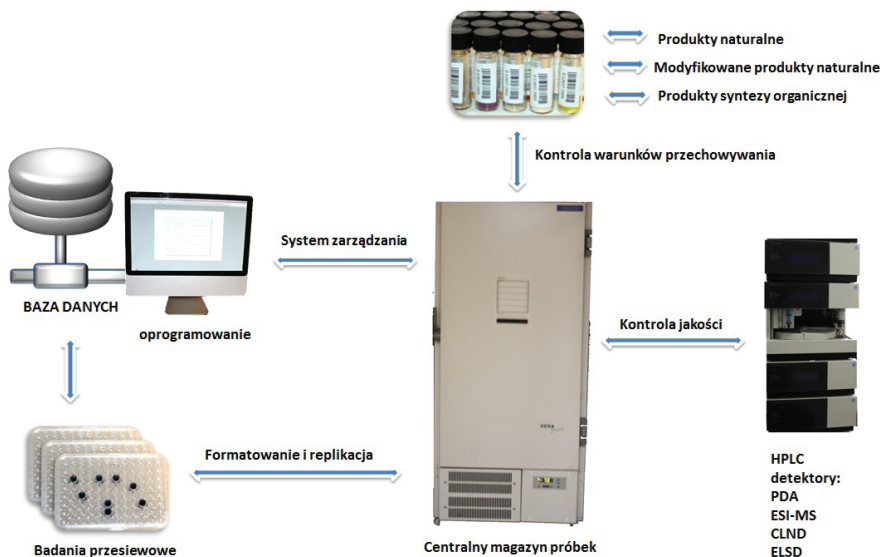
W tak zdefiniowanej przestrzeni chemicznej dwie sąsiadujące ze sobą cząsteczki odznacza zbliżony zbiór wartości numerycznych dla przyjętych deskryptorów cech strukturalnych. Niestety dotychczas nie udało się skonstruować skutecznych algorytmów, które pozwalałyby przewidywać strukturę na podstawie wartości numerycznych samych tylko deskryptorów. Dlatego nawigacja przestrzeni chemicznej wymaga znajomości struktur wszystkich związków w niej zawartych.

Nowatorskie podejście do problemu eksploracji nieznanymi obszarów przestrzeni chemicznej, które pozwala na znalezienie unikalnych związków aktywnych biologicznie przedstawił Raymond i van Deursen [30]. Przestrzeń chemiczną udaje się przybliżyć w formie grafu, którego wierzchołki reprezentować będą cząsteczki, a krawędzie zmiany, jakie dokonują się w obrębie struktury. W opisanej w ten sposób przestrzeni chemicznej dwie sąsiadujące ze sobą cząsteczki odróżnia niewielka zmiana struktury, która może polegać na przegrupowaniu bądź zmianie charakteru atomów, jak również dodaniu lub usunięciu dodatkowego atomu lub wiązania. Na potrzeby nawigacji kierunków w obszarach przestrzeni chemicznej skonstruowano specjalny program o nazwie „Spaceship” [31]. Zastosowany w nim algorytm opiera się na cyklicznie powtarzanej operacji wprowadzania niewielkich modyfikacji strukturalnych oraz selekcji tylko tych, spośród otrzymanego w ten sposób zbioru cząsteczek, które wykazują największe podobieństwo do struktury docelowej mierzone wartością współczynnika Tanimoto (ang. *Tanimoto coefficient*) [32]. Warto w tym miejscu nadmienić, iż znanych jest obecnie kilka użytecznych programów dedykowanych tworzeniu bibliotek wirtualnych [33].

Większość z nich wykorzystuje znane bloki budulcowe oraz reakcje chemiczne, umożliwiając przygotowanie łatwych do syntezy cząsteczek, z których często korzysta się w kampaniach wirtualnych badań przesiewowych (ang. *virtual screening*) [34].

2. INFRASTRUKTURA EKSPERYMENTALNYCH BIBLIOTEK ZWIĄZKÓW

Biblioteki eksperymentalne zwykle składają się z czterech zasadniczych elementów: 1) centralnego magazynu próbek, 2) oprogramowania oraz bazy danych pozwalających analizować zgromadzone w testach przesiewowych dane doświadczalne, 3) zestawu analitycznego, który pozwala na bieżąco śledzić, jakość zdeponowanych związków oraz 4) zautomatyzowanych stacji pipetujących, służących przygotowaniu płytek macierzystych oraz ich dalszej replikacji [35].



Rysunek 1. Schemat przykładowej infrastruktury eksperymentalnej biblioteki związków chemicznych
Figure 1. Schematic diagram of an example infrastructure of experimental chemical compounds library

W skład zaawansowanych systemów analitycznych pozwalających na bieżąco kontrolować, jakość zdeponowanych w bibliotece próbek wchodzi wysokosprawny chromatograf ciekłowy (HPLC) wyposażony, w co najmniej trzy niezależne detektory wykorzystujące różne metody detekcji [36]. Spektrometr masowy służy głównie celom identyfikacji substancji, która w zarejestrowanym widmie mas powinna dawać spodziewany sygnał jonu molekularnego bądź pseudomolekularnego. Z kolei czystość próbki określa się metodą wysokosprawnej chromatografii ciekłowej zwykle z użyciem detektora z matrycą fotodiodową DAD (ang. *Diode Array Detector*), a w przypadku cząsteczek słabo absorbujących bądź też nieabsorbujących promieniowania w zakresie Uv-Vis aerolowego detektora promieniowania rozproszonego ELSD (ang. *Evaporative Light Scattering Detector*) [37]. Substancje przeznaczone do badań przesiewowych standardowo rozpuszcza się w dimetylosulfotlenku (DMSO) i przechowuje w zabezpieczonych płytkach wielodołkowych. Niestety wysoka higroskopijność DMSO sprawia, iż po upływie pewnego czasu zdarza się obserwować

wytrącanie części substancji rozpuszczonej, szczególnie w przypadku związków o podwyższonej lipofilowości [38]. Dlatego szczególną uwagę przywiązuje się do problemu zmian stężenia roztworów przechowywanych przez dłuższy okres czasu. Stężenia substancji zawierających atomy azotu oznacza się zwykle metodami chromatografii cieczowej z użyciem detektorów chemiluminescencji azotu CLND (ang. *Chemiluminescent Nitrogen Detector*) [39]. W przypadku roztworów substancji nie zawierających atomów azotu stosuje się głównie metody analizy ilościowej oparte na technice ^1H NMR, w tym szczególnie popularną metodę wzorca wewnętrznego [40].

Najważniejszy element biblioteki eksperymentalnej stanowi jednak baza danych zawierająca zbiór zakodowanych w odpowiednim formacie [41] informacji niezbędnych do zidentyfikowania zdeponowanych w jej infrastrukturze związków. Standardowo oprócz danych strukturalnych w bazie danych umieszcza się również informacje o dostępnej ilości, czystości oraz miejscu i warunkach przechowywania próbki. Ponadto baza danych często zawiera kluczowe z punktu widzenia opracowywania procedur testów przesiewowych wyniki badań fizykochemicznych. Przykładowo związki wykazujące silną wewnętrzną fluorescencję, w testach przesiewowych z detekcją fluorescencyjną będą dawać wyniki fałszywie dodatnie (ang. *false positives*) [42]. Z tego względu w bazie danych umieszcza się dodatkową adnotację o możliwej koincydencji ich właściwości z detektorem fluorymetrycznym.

3. PROJEKTOWANIE STRUKTURY I WŁAŚCIWOŚCI BIBLIOTEK

Podczas tworzenia bibliotek związków pierwszej generacji, jakie pojawiły się na początku lat dziewięćdziesiątych nie przywiązywano większej wagi do sposobu ich przygotowywania starając się przeszukiwać jak największe kolekcje w możliwie najkrótszym czasie.

Pomimo wdrożenia zaawansowanych technologii, a w szczególności wysoko-wydajnych metod przesiewania, które obecnie pozwalają testować dziennie zasoby dochodzące nawet do 1 miliona związków [43], nie zaobserwowano znaczącego zwiększenia częstotliwości odkrywania nowych substancji wiodących. Wynika z tego, iż powodzenie kampanii poszukiwania nowych substancji wiodących należy uzależnić nie tyle od ilości, co od właściwego wyboru cząsteczek reprezentujących niewielkie fragmenty przestrzeni chemicznej.

Podejście do zagadnień projektowania właściwości bibliotek zależy w pierwszej kolejności od aktualnego stanu wiedzy o celu biologicznym oraz rozpoznanych możliwości modulacji jego aktywności. Biblioteki generyczne (ang. *generic, unbiased, random*) odpowiadają potrzebie badań przesiewowych skierowanym na nowo odkryte cele biologiczne, których struktura nie została jeszcze w pełni wyjaśniona. Biblioteki generyczne można przygotowywać w drodze bezpośredniej selekcji cząsteczek spośród znanych kolekcji związków [44]. Znacznie częściej biblioteki generyczne przygotowuje się *de novo* funkcjonalizując szkielet znanych cząsteczek,

wykorzystując strategię syntezy zorientowanej na różnorodność (ang. *Diversity Oriented Synthesis, DOS*) [45].

Biblioteki generyczne przygotowywane metodą bezpośredniej selekcji zwykle zawierają cząsteczki przypominające budową motywy strukturalne znanych leków, a przez to zwane popularnie „uprzywilejowanymi” (ang. *privileged scaffolds*) [46], bądź też zawierające kluczowe z punktu widzenia oddziaływań wiążących farmakofory [47]. Najczęściej korzysta się jednak ze zbiorów cząsteczek, które nie zawierają, co prawda uprzywilejowanych motywów struktury, ale bogate są w łatwe do funkcjonalizacji grupy funkcyjne stanowiąc cenne substraty do syntezy zorientowanej na różnorodność.

Synteza zorientowana na różnorodność to umyślna, równoczesna i efektywna synteza więcej niż jednego strukturalnie zróżnicowanego związku docelowego o zaawansowanym stopniu skomplikowania szkieletu [48]. W syntezie zorientowanej na różnorodność dostępne bloki budulcowe służą wzbogaceniu szkieletu związku wiodącego w dodatkowe grupy funkcyjne oraz relacje stereochemiczne.

Ścieżki syntetyczne stosowane w syntezie zorientowanej na różnorodność powinny być nie tylko rozgałęzione, ale również rozbieżne (ang. *divergent*), pozwalając w ten sposób na szybkie i efektywne przekształcenie zbioru prostych i stosunkowo podobnych do siebie związków w reprezentatywny zbiór cząsteczek o większym stopniu skomplikowania struktury szkieletu i płynącej stąd różnorodności [49].

Skonstruowane w ten sposób biblioteki generyczne mogą obejmować swym zakresem bardzo odległe obszary przestrzeni chemicznej, a płynąca z nich różnorodność pozwala szczegółowo analizować funkcje enzymów zaangażowanych w kluczowe szlaki biochemiczne dostarczając niezbędnych informacji o kluczowych celach terapeutycznych.

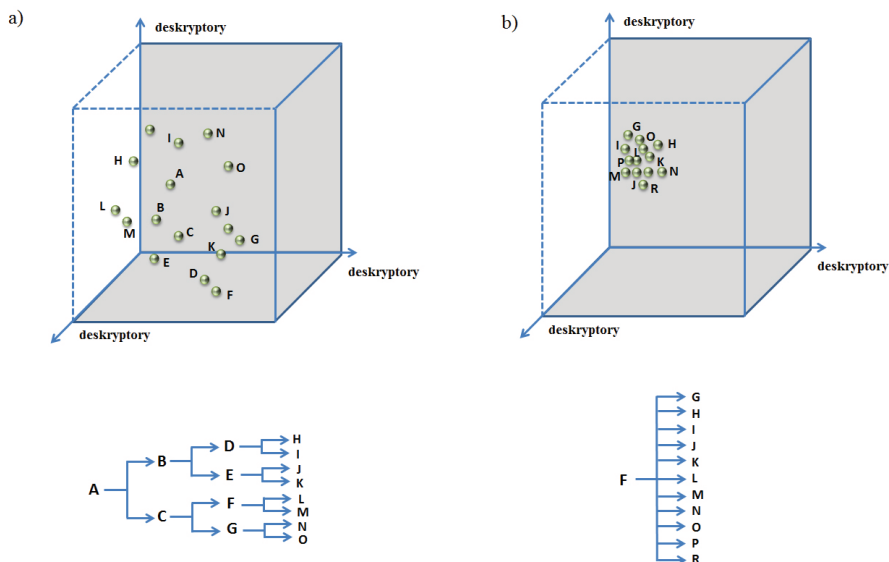
Biblioteki ukierunkowane (ang. *focused, biased, directed*) [50] zwykle przygotowuje się z myślą o badaniach przesiewowych wobec określonego przedstawiciela danej klasy enzymów.

Proces doboru cząsteczek spośród większych i bardziej zróżnicowanych kolekcji opiera się na szczegółowych informacjach o strukturze docelowego enzymu, a przynajmniej na znajomości kluczowych farmakoforów zaangażowanych w proces wiązania ligandów. Często biblioteki ukierunkowane wyprowadza się z większych kolekcji znanych związków w procesie selekcji *in silico* [51]. Zarówno na etapie wstępnego doboru kandydatów, jak i dalszej ewaluacji bibliotek ukierunkowanych korzysta się powszechnie z algorytmów genetycznych [52], które przeszukując duże przestrzenie możliwych rozwiązań pozwalają znaleźć najlepsze, chociaż wcale niekoniecznie optymalne rozwiązanie dla skomplikowanych i wielowymiarowych problemów optymalizacji.

Weber i współpracownicy [53] posłużyli się algorytmem genetycznym w procesie projektowania biblioteki kombinatorycznej celowanej na trombinę, znajdując silny inhibitor w cyklu syntezy zaledwie 400 ze 160,000 możliwych związków.

Biblioteki celowane (ang. *target-family-oriented libraries*) [54] skierowane są na poszczególne klasy enzymów takie jak metaloproteazy, kinazy czy fosfatazy. Tworząc biblioteki celowane dysponuje się zwykle niekompletnym zbiorem informacji, które dają pewne tylko wyobrażenie o możliwej strukturze docelowego miejsca wiążącego. Niemniej jednak poszukując nowej substancji aktywnej wobec przedstawiciela znanej klasy enzymów, wystarczy posłużyć się celowaną biblioteką bliskich analogów wcześniej rozpoznanej substancji wiodącej. Przykładowo Rice i współpracownicy [55] wychodząc ze struktury wiodącej jednego z rozpoznanych inhibitorów fosfatazy przygotowali bibliotekę celowaną, dzięki której udało się znaleźć nowe inhibitory dla czterech różnych fosfataz, o podwójnej specyficzności.

Strategia syntezy ukierunkowanej na cel (ang. *Target Oriented Synthesis, TOS*) służy przygotowaniu struktury wiodącej, z której w drodze dalszej funkcjonalizacji wyprowadza się ukierunkowaną bibliotekę strukturalnie spokrewnionych analogów. Obecnie w literaturze znanych jest wiele uprzywilejowanych chemotypów (ang. *privileged structures*) [56], których dalsza funkcjonalizacja prowadzi do wielu grup aktywnych modulatorów strategicznych celów biologicznych [57].



Rysunek 2. Porównanie struktury przestrzeni chemicznej oraz strategii syntezy dla: a) bibliotek generycznych oraz b) bibliotek ukierunkowanych

Figure 2. A comparison of chemical space structure and synthetic strategy for: a) generic libraries and b) directed libraries

Chociaż biblioteki ukierunkowane wokół jednego tylko, konkretnego chemotypu reprezentują niewielki fragment przestrzeni chemicznej, to pozwalają wyprowadzać kluczowe z punktu widzenia projektowania leków zależności, jakie zarysowują się między strukturą a wynikającą z niej aktywnością. Biblioteki ukierunkowane przygotowuje się najczęściej metodami TOS wykorzystując przy tym strategię analizy retrosyntetycznej.

4. NORMALIZACJA I PROFILOWANIE WŁAŚCIWOŚCI BIBLIOTEK METODAMI *IN SILICO*

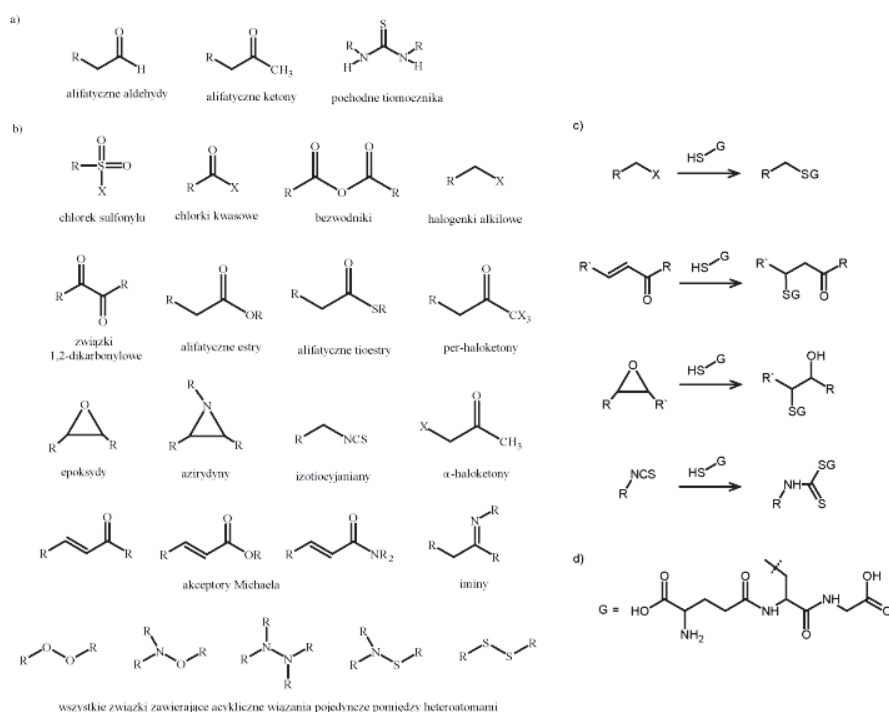
Wszystkie dostępne informacje o związkach zdeponowanych w bibliotece eksperymentalnej muszą zostać zgromadzone w centralnej bazie danych, gdzie podaje się je kolejno zabiegom normalizacji. Stosując narzędzia chemoinformatyczne przeznaczone specjalnie do obsługi baz danych w pierwszej kolejności usuwa się symbole izotopów, cząsteczek wody hydratacyjnej i przeciwjonów, następnie przeprowadza się standaryzację ładunków formalnych, a na końcu potwierdza się zgodność otrzymanej w ten sposób dwuwymiarowej reprezentacji struktury z obowiązującymi zasadami wartościowości [58]. Na szczególną uwagę zwraca się również przy standaryzacji informacji o obecności centrów stereogenicznych, gdyż powszechnie stosowane wzory klinowe są niewłaściwie przetwarzane przez większość systemów komputerowych [59], co przy późniejszej konwersji reprezentacji dwuwymiarowych na strukturę przestrzenną może prowadzić do rażących błędów w analizie SAR (ang. *Structure-Activity Relationship*) [60].

Operacje porządkowania i standaryzacji baz danych prowadzi się zwykle na liniowych reprezentacjach struktury zapisanej w kanonicznym kodzie SMILES (ang. *Simplified Molecular Input Line Entry Specification*) [61]. Kod kanoniczny SMILES pozwala przetransponować dowolny wzór strukturalny do postaci zapisu liniowego, który można z kolei łatwo przeprowadzić w kod alfanumeryczny ASCII (ang. *American Standard Code for Information Interchange*), przez co nadaje się do indeksowania substancji zawartych w bazach danych. Kodowanie cech strukturalnych w postaci wektorów binarnych (przedstawianych w postaci ciągu jedynek i zer) ma tę dodatkową zaletę, iż pozwala na szybką i jednoznaczną identyfikację określonych cech struktury. Przed przystąpieniem do przesiewania zasobów oraz analizy stopnia zróżnicowania struktury bibliotek, wszystkie cechy strukturalne cząsteczek należy wyrazić w postaci liczbowej za pomocą odpowiednio wybranych deskryptorów.

Porządkowanie zasobów baz danych chemicznych bibliotek obejmuje między innymi analizę zawartości, gdzie poszukuje się podwielokrotności tej samej substancji. W przypadku stwierdzenia w bibliotece obecności kilku próbek tej samej substancji zwykle zachowuje się próbkę o największym stopniu czystości. Uporządkowaną w ten sposób bazę danych poddaje się następnie przesiewaniu właściwości, które zwykle ma na celu wybranie tylko tych spośród milionów zdeponowanych struktur, które spełniają założone kryteria. Należy przy tym jednak pamiętać, iż od doboru właściwych kryteriów przesiewania właściwości zależeć będzie, jakość otrzymanej w ten sposób biblioteki. W przypadku niewłaściwie dobranych kryteriów istnieje uzasadniona obawa nieumyślnego przeoczenia tych cząsteczek, które formalnie nie spełniają założonych kryteriów a mimo to wykazują pożądaną aktywność.

Rozpoznanych jest obecnie kilkanaście typów klas związków, które w testach przesiewowych zwykły dawać wyniki fałszywie dodatnie [62]. Z tego właśnie względu przyjęło się w pierwszej kolejności przesiewać bazy danych pod kątem nie-

pożądanych właściwości fizykochemicznych [63] oraz toksycznych [64]. Stosując odpowiednio dobrane filtry [65] pożądanych właściwości z baz danych usuwa się wszystkie związki zawierające w strukturze reaktywne, jak również hydrolytycznie niestabilne, ugrupowania. W szczególności należy tutaj wspomnieć o takich klasach związków jak chlorki kwasowe, bezwodniki, epoksydy, akceptory reakcji Michaela, estry kwasów sulfonowych, iminy i inne [66]. Związki zawierające reaktywne grupy funkcyjne wchodzą w reakcje z glutationem oraz grupami tiolowymi peptydów i białek wykazując słabą stabilność w osoczu krwi ludzkiej. Należy odrzucić również wszystkie cząsteczki zawierające w swej strukturze fragmenty ugrupowań podejrzanych o działanie cytotoksyczne a w szczególności pochodne 4-piperidonu oraz tiomocznika [67].



Rysunek 3. Wybrane klasy: a) związków podejrzanych o działanie cytotoksyczne, b) związków niestabilnych w środowisku fizjologicznym, oraz c) produktów ich reakcji z nukleofilowymi fragmentami białek i peptydów takich jak d) glutation. Na rysunku przyjęto oznaczenia: X=F, Cl, Br, I, tosyl; R=alkil, aryl, heteroaryl; G=fragment białka, bądź peptydu (np. glutation)

Figure 3. Selected examples of : a) compounds with possible cytotoxic activity, b) compounds unstable under physiological conditions, and c) products of their reactions with the nucleophilic sites of proteins and peptides such as d) glutathione. The following abbreviations are used: X=F, Cl, Br, I, tosyl; R=alkyl, aryl, heteroaryl; G=part of protein or peptide (e.g. glutathione)

Wstępnej oceny kluczowych z punktu widzenia biodostępności właściwości ADME-Tox (ang. *Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity*) można dokonać stosując dostępne narzędzia chemoinformatyczne w tym popularną platformę ZINC wykorzystującą niekomercyjną wersję programu FILTER [68]. Warto przy tym również nadmienić, iż aktualna wersja algorytmu programu FILTER zawiera nieco ponad sto empirycznych reguł oceny stabilności struktury, co pozwala odrzucić znaczącą większość reaktywnych i hydrolitycznie niestabilnych cząsteczek.

W tym miejscu należy również stanowczo podkreślić fakt, iż każdego rodzaju profilowanie właściwości prowadzi się zawsze w kontekście przyjętych oczekiwań. A zatem w przypadku bibliotek związków ukierunkowanych na leki antynowotworowe należy stosować wyłącznie „miękkie” kryteria filtrowania właściwości, w przeciwnym wypadku odrzucilibyśmy środki alkilujące z grupy β -chloroetyloamin, etylenoimin czy epoksydów, a więc znaczącą większość stosowanych dzisiaj związków o udowodnionej aktywności przeciwnowotworowej [69].

Przed przystąpieniem do wirtualnego skriningu [70] zwykle dokonuje się jeszcze parametrycznej oceny, jakości skonstruowanej biblioteki. Wszystkie reprezentacje struktur wchodzących w skład bibliotek wyraża się przez deskryptory fizykochemiczne i topologiczne, które niosą ze sobą zakodowane informacje o właściwościach makroskopowych takich jak lipofilowość czy cechach topologicznych takich jak stopień rozgałęzienia struktury [71]. Szczegółowe omówienie wszystkich typów stosowanych deskryptorów wykracza poza ramy niniejszego opracowania. Czytelnik zainteresowany zagadnieniem opisu struktury cząsteczki za pomocą deskryptorów powinien prześledzić jedną z wcześniej wydanych monografii [72]. Należy przy tym podkreślić, że mimo ciągłego wprowadzania nowych typów deskryptorów jak dotychczas nie udało się wypracować uniwersalnej metody pomiaru stopnia zróżnicowania biblioteki związków [73].

Standardowo do parametrycznej oceny stopnia zróżnicowania kolekcji związków stosuje się współczynnik Tanimoto (ang. *Tanimoto coefficient*) [74], którego wartość zmienia się w wąskim przedziale między 0 a 1. Graniczne wartości pojawiają się w przypadku, gdy porównywane ze sobą struktury nie mają wspólnych deskryptorów ($S_T = 0$) bądź też wszystkie z analizowanych deskryptorów są identyczne ($S_T = 1$).

Nierozłącznie z terminem różnorodności wiąże się również pojęcie stopnia skomplikowania struktury [75]. Chociaż w literaturze wciąż toczy się debata o znaczeniu stopnia skomplikowania struktury to zwykle przyjmuje się, iż bardziej złożone w swej naturze cząsteczki oddziałują z biocząsteczkami w sposób bardziej selektywny a przy tym również specyficzny [24, 76].

5. BIBLIOTEKI GENERYCZNE

Na początku lat dziewięćdziesiątych zauważono, iż przeważająca część grupy początkowo dobrze rokujących substancji nie przeszła ostatecznie nawet I fazy badań klinicznych głównie ze względu na niekorzystną charakterystykę farmakokinetyczną (ang. *pharmacokinetics*, PK) [77]. Skuteczność działania leku zależy nie tylko od pożądanej aktywności biologicznej, ale również biodostępności, która określa zdolność danej substancji do przenikania przez błony biologiczne.

Pod koniec lat dziewięćdziesiątych Lipiński [78] przeprowadził statystyczną analizę właściwości fizykochemicznych znanych leków formując słynną już dziś „regułę pięciu” (ang. *Rule of Five*, RO5) [79]. W myśl „reguły pięciu” substancję można uznać za dobrze wchłaniającą po podaniu doustnym, jeżeli jej masa cząsteczkowa nie przekracza 500 Da, wartość logarytmu ze współczynnika podziału między oktanol i wodę ($\log P$) jest mniejsza od pięciu, liczba donorów wiązania wodorowego jest mniejsza od pięciu a liczba akceptorów wiązania wodorowego wyrażona przez sumę atomów tlenu i azotu nie przekracza dziesięciu. Późniejsze uściślenia zasady pięciu nakładają dodatkowe ograniczenia na obszar powierzchni polarnej (ang. *Polar Surface Area*, PSA) zdefiniowany poprzez sumę donorów i akceptorów wiązań wodorowych, która nie powinna przekraczać dwunastu [80], natomiast liczbę wiązań zdolnych do swobodnego obrotu zwykle zawęża się do dziesięciu [81].

Przy projektowaniu bibliotek związków nie należy zapominać, iż reguła pięciu określa tylko niezbędne warunki, jakie powinien spełniać każda dobrze przyswajana po podaniu doustnym substancja i z tego względu nie powinna przesądzać o ostatecznej kwalifikacji kandydatów na substancję wiodącą. Istnieje spora grupa znanych przypadków odstępstw od reguły pięciu, do której zalicza się makrocykliczne produkty naturalne wytwarzane przez grzyby, bakterie i rośliny [82]. Substancje o masie cząsteczkowej większej niż 500 Da mogą wykazywać pożądaną biodostępność, jeżeli włączyć w ich strukturę fragmenty odpowiedzialne za usztywnienie konformacji.

Szczegółowa analiza procesu optymalizacji struktury substancji wiodącej wykazała tendencję wprowadzania podstawników, które odpowiadają za wzrost lipilności cząsteczki [83]. Z tego względu często zdarza się, iż kryteria doboru kandydatów na substancje wiodące zawęża się do reguły czterech zdefiniowanej analogicznie do reguły pięciu Lipińskiego. Dalsza analiza właściwości fizykochemicznych leków [84], które zostały już dopuszczone do obrotu pozwoliła uściślić kryteria doboru odpowiednich kandydatów na substancje wiodące.

Kandydat na związek wiodący nie powinien zawierać więcej niż trzech skondensowanych ze sobą pierścieni aromatycznych, bowiem tego typu fragmenty struktury sprzyjają powstawaniu w warunkach fizjologicznych cytotoksycznych epoksydów oraz chinonów [85]. Pożądane jest również, aby kandydat na substancję wiodącą zawierał mniej niż cztery atomy halogenu, przy czym ze względu na szczególnie właściwości farmakoforów zawierających atomy fluoru [86], dopuszcza się współistnienie dwóch grup CF_3 . W końcu należy mieć również na uwadze fakt, iż zmniejszenie długości alifatycznego łańcucha oraz wielkości makrocyklicznego

pierścienia zawierającego do 22 atomów przyczynia się do ograniczenia labilności konformacyjnej, a tym samym ułatwia racjonalne projektowanie dalszych analogów substancji wiodącej.

6. BIBLIOTEKI FRAGMENTÓW

Biblioteki fragmentów (ang. *fragment-based libraries*) składają się z niewielkich cząsteczek o stosunkowo niskim powinowactwie do celów biologicznych, które zwyczajowo przyjęło się nazywać „fragmentami” [87]. Biblioteki fragmentów złożone z cząsteczek o niewielkim stopniu skomplikowania struktury odznacza szczególnie wysokie prawdopodobieństwo wystąpienia komplementarnego układu oddziaływań wiążących.

Związki zaliczane do biblioteki fragmentów muszą spełniać ściśle określone kryteria zwane popularnie „regułą trzech” (ang. *rule of three*, RO3) [88], Zgodnie z regułą trzech związki wchodzące w skład biblioteki fragmentów powinny posiadać masę cząsteczkową nie większą niż 300 Da, wartość logarytmu ze współczynnika podziału między oktanol i wodę (logP) mniejszą niż trzy, a przy tym zawierać nie więcej niż trzy H-donory (HBD) i trzy akceptory wiązania wodorowego (HBA).

Ponadto należy przy tym podkreślić, iż w przypadku bibliotek fragmentów znacznie większy nacisk kładzie się na wypadkową liczbę ciężkich atomów niż na masę cząsteczkową, bowiem atomy o wysokiej liczbie atomowej takie jak atomy bromu czy jodu wnoszą znaczący wkład w masę cząsteczkową. Z tego względu właściwości bibliotek fragmentów przyjęło się charakteryzować w oparciu o dodatkowy parametr zwany „efektywnością liganda” (ang. *Ligand Efficiency*, *LE*) zdefiniowany poprzez uśrednioną wartość energii wiązania, która przypada na pojedynczy atom bądź jednostkę masy [89]. Jeżeli jednak „efektywność liganda” musimy odnieść do jego masy cząsteczkowej wówczas należy posługiwać się procentowym indeksem efektywności (ang. *percentage efficiency index*) lub indeksem efektywności wiązania (ang. *binding efficiency index*) [90]. Dla typowej substancji o masie cząsteczkowej 333 Da hamującej w połowie aktywność enzymu przy stężeniu 10 μM procentowy indeks efektywności wynosi 1,5. Niskie wartości IC_{50} mieszczą się zazwyczaj między 0,1 a 1,0 mM, sprawiają, iż związki tworzące biblioteki fragmentów muszą być testowane przy stosunkowo wysokich stężeniach [91]. Naturalnym ograniczeniem stosowania biblioteki fragmentów w badaniach przesiewowych wydaje się być rozpuszczalność samego liganda, która powinna pozwalać na przygotowanie roztworów o odpowiednio wysokim stężeniu [92].

Niskie powinowactwo, słaba rozpuszczalność oraz konieczność stosowania wysokich stężeń sprawiają, iż w badaniach przesiewowych, w których korzysta się z bibliotek fragmentów częściej udaje się natrafić na substancję aktywną niż ma to zwykle miejsce w przypadku analogicznych bibliotek substancji lekopodobnych.

Liczbę cząsteczek zawierających do 11 atomów, a których masa cząsteczkowa nie przekracza 300 Da szacuje się na około 13 milionów, co znacząco zawęża obszar

przestrzeni chemicznej, a jednocześnie również wielkość reprezentujących ją bibliotek fragmentów. Wielkość bibliotek fragmentów zmienia się w dosyć szerokim zakresie między 100 a 500 cząsteczek dla typowej wielkości bibliotek celowanych dochodząc nawet do 20,000 związków w przypadku bibliotek generycznych. Zwykle jednak typowe biblioteki fragmentów zawierają od 2 do 5 tysięcy związków [93] reprezentując przy tym porównywalnej wielkości fragment przestrzeni chemicznej, co liczące kilka milionów biblioteki związków lekopodobnych [94].

Przygotowując biblioteki fragmentów korzysta się zwykle z zasobów wirtualnych baz danych takich jak wcześniej już wspomniane bazy GDB-10 czy GDB-13. Alternatywne podejście do sposobu konstrukcji bibliotek fragmentów opiera się na wyprowadzeniu uprzywilejowanych fragmentów struktury ze znanych już cząsteczek leków. Analiza zasobów bazy CMC (ang. *Comprehensive Medicinal Chemistry*) dostarczyła 32 typy unikalnych szkieletów, które spotyka się w blisko połowie znanych leków [95]. Łącząc w drodze kombinatorycznej uprzywilejowane fragmenty szkieletów i łańcuchów bocznych [96] wyprowadzono bibliotekę SHAPES liczącą w pierwowzorze 132 fragmenty [97]. Wszystkie związki z biblioteki fragmentów SHAPES cechuje niewielka masa cząsteczkowa między 68-341 Da, dobra rozpuszczalność w wodzie, wysoka trwałość chemiczna oraz brak tendencji do agregacji przy stężeniu 1 mM.

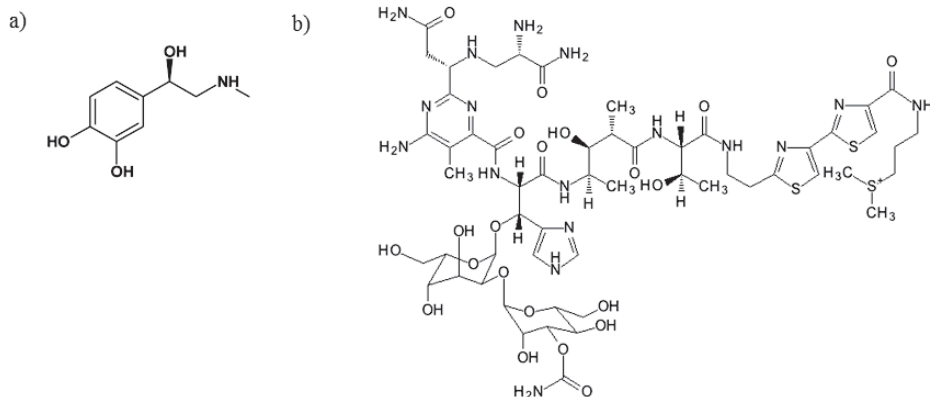
Z kolei procedura kombinatorycznej analizy retrosyntetycznej (ang. *Retrosynthetic Combinatorial Analysis Procedure*, RECAP) [98] stanowi oryginalne uzupełnienie opartej na samym tylko podobieństwie kształtów metodzie SHAPES.

Należy podkreślić, iż metody RECAP i SHAPES należy stosować ze szczególną ostrożnością, często, bowiem składowe fragmenty struktury, wiążą się w zupełnie innych miejscach niszy wiążącej, niż cząsteczka wyjściowego liganda, z której zostały wprowadzone [99].

Projektując bibliotekę fragmentów należy brać pod uwagę również możliwości późniejszej funkcjonalizacji pierwotnie wyselekcjonowanej grupy fragmentów. Należy przy tym unikać wprowadzania reaktywnych fragmentów a w szczególności grup funkcyjnych, które mogłyby zakłócać przebieg testów enzymatycznych. Te dwa z pozoru przeciwstawne zadania udaje się rozwiązywać przez uwzględnienie strategii maskowania reaktywnych grup funkcyjnych [100].

7. BIBLIOTEKI ZWIĄZKÓW NATURALNYCH

Przyroda dysponując ograniczoną liczbą bloków budulcowych wypracowała niespotykaną w warunkach laboratoryjnych bioróżnorodność. Na Rysunku 4 przedstawiono dwa przykłady spotykanych w przyrodzie związków organicznych o granicznym zróżnicowaniu struktury.



Rysunek 4. Przykłady bioróżnorodności spotykanej w strukturze naturalnych związków organicznych: a) adrenalina, b) antybiotyk glikopeptydowy – bleomycyna

Figure 4. Examples of biodiversity encountered in natural organic compounds: a) adrenaline, b) antibiotic – bleomycin

Znanych jest dziś wiele mikroorganizmów, które przystosowały się do życia w ekstremalnych warunkach środowiska, jakie panują na lodowcach polarnych [101], głębinach morskich [102] i ciemnych jaskiniach [103]. Mikroorganizmy stanowią jedno z najbogatszych źródeł zróżnicowanych względem struktury i właściwości substancji biologicznie aktywnych, które wykorzystuje się obecnie, jako składniki aktywne leków z grupy antybiotyków, immunosupresantów czy też obniżających poziom cholesterolu we krwi statyn. Ocenia się, że na Ziemi spotkać można blisko 1,5 miliona możliwych gatunków grzybów oraz 1,5 milionów gatunków glonów i organizmów prokariotycznych [104]. Z 250,000 gatunków roślin, jakie mogą zamieszkiwać ziemię tylko 10% posłużyło dotychczas, jako źródło materiału do oceny aktywności biologicznej [105]. Inne źródła substancji aktywnych, a w tym morskie ślimaki oraz insekty [106], ze względu na trudności z izolacją wystarczającej ilości związku aktywnego mają obecnie jedynie drugorzędne znaczenie, i nie będą tu dyskutowane.

Standardową bibliotekę związków naturalnych przygotowuje się w oparciu o bioróżnorodność spotykaną w królestwie roślin oraz organizmów prokariotycznych.

W niniejszej pracy ograniczymy się jedynie do bibliotek substancji naturalnych pozyskanych z ekstraktów roślinnych. Wybrane metody selekcji gatunków roślin bogatych w różnorodne substancje aktywne omówiono szczegółowo w wielu pracach przeglądowych [107].

Wyselekcjonowany materiał roślinny [108] poddaje się zabiegom utrwalania, które mają na celu zapobiec enzymatycznej hydrolizie składników aktywnych. W tym celu surowy materiał roślinny poddaje się najczęściej suszeniu w umiarkowanej temperaturze chroniąc go przed dostępem światła [109]. W przypadku szczególnie nietrwałych substancji aktywnych materiał roślinny utrwalą się przez zamrażanie, liofilizację bądź działanie par alkoholu. Po utrwaleniu materiał roślinny

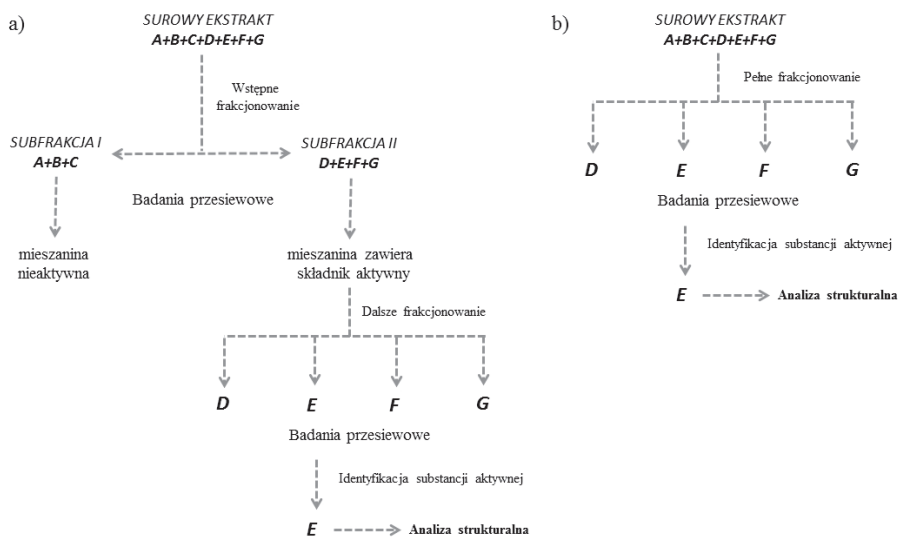
rozdrabnia się w odpowiednich mózdzierzach do konsystencji proszku, który poddaje się w dalszej kolejności procesowi ekstrakcji. Jeżeli nie jest znana natura chemiczna składników, wówczas procedura izolacji składników aktywnych obejmuje kilka następujących po sobie procesów ekstrakcji z użyciem coraz bardziej polarnych rozpuszczalników lub ich mieszanin. Surowy ekstrakt poddaje się często procesowi usuwania domieszek tanin znanych ze swoich zdolności do wytrącania białek [110], a przez to mogących wpływać niekorzystnie na przebieg testów enzymatycznych stosowanych w badaniach przesiewowych.

Surowy ekstrakt przyjęło włączać się do biblioteki związków naturalnych, jednak obecne w ekstrakcie domieszki substancji cytotoksycznych mogą skutecznie maskować aktywność pozostałych składników. Z tego względu surowy ekstrakt zwykle poddaje się procesowi subfrakcjonowania upraszczając w ten sposób identyfikację poszczególnych składników [111]. Chociaż w zależności od zastosowanej metody oczyszczania poszczególne subfrakcje mogą nawet w znacznym stopniu różnić się czystością, to zwykle jednak przeważają mieszaniny kilku tylko składników. W przypadku odnotowania aktywności w badaniach przesiewowych zebrane subfrakcje rozdziela się w preparatywnym systemie wysokosprawnej chromatografii cieczerwowej (HPLC) na indywidualne składniki, które bada się ponownie pod kątem pożądanej aktywności.

Z kolei w popularnej strategii frakcjonowania nakierowanego na bioaktywność [112] (ang. *bioactivity-guided fractionation*), surowy ekstrakt rozdziela się bezpośrednio z pominięciem etapu subfrakcjonowania na frakcje indywidualnych składników, z których każda poddawana jest z osobna testom przesiewowym. Zdarza się jednak, iż w trakcie procesu frakcjonowania traci się bezpowrotnie te spośród składników aktywnych, które w ekstrakcie występowały w nieznacznych tylko ilościach.

Ponadto strategia frakcjonowania nakierowanego na bioaktywność pomija aspekt synergizmu farmakodynamicznego [113], w którym przyjmuje się, że za obserwowany efekt biologiczny odpowiada kombinacja składników aktywnych. Efekt synergizmu farmakodynamicznego [114] obserwowano już wcześniej min. w badaniach nad składnikami żeń-szenia właściwego (łac. *Panax ginseng*) [115], gdzie materiał roślinny wykazywał wyższą aktywność niż mogłoby to wynikać z prostego sumowania aktywności poszczególnych jej składników.

Stosowanie frakcji czystych składników w testach przesiewowych ma jednak tę dodatkową zaletę, iż pozwala nieznacznie ograniczyć koszty badań strukturalnych gdyż tylko frakcja składnika aktywnego poddawana jest szczegółowej analizie fizykochemicznej. Z drugiej jednak strony połączenie zaawansowania technik przepływowych i metod spektroskopowych, a w szczególności metod magnetycznego rezonansu jądrowego, pozwala dziś ustalać strukturę związków naturalnych wyizolowanych w ilości nie większej niż 1 mg [116].



Rysunek 5. Najpopularniejsze strategie przygotowywania i przesiewania bibliotek związków naturalnych: a) subfrakcjonowanie, b) frakcjonowanie nakierowane na bioaktywność

Figure 5. The most common strategies of preparation and activity screening of natural compounds libraries: a) subfractionation, b) subfractionation focused on bioactivity

Niestety biblioteki związków naturalnych nie są pozbawione szeregu wad, które znacznie ograniczają możliwości ich praktycznego wykorzystania. Po pierwsze, przygotowanie kolekcji związków naturalnych jest bardzo kosztowne obejmuje, bowiem konieczność sprowadzenia z odległych zakątków rzadkich a przez to drogich gatunków roślin, zwierząt i grzybów. W przypadku stwierdzenia obecności substancji aktywnej w badanym ekstrakcie należy wykonać żmudny a przy tym czasochłonny zabieg dekonwolucji mieszaniny, który pozwala zidentyfikować składnik aktywny. W przypadku, gdy uda się wyizolować nieopisany jak dotąd w literaturze związek należy przeprowadzić dodatkowe badania zmierzające do ustalenia struktury, które wymagają stosowania zaawansowanych metod spektroskopowych [117]. Nierzadko zdarza się jednak, iż z trudem wyizolowana substancja aktywna znana jest już od dłuższego czasu, a co gorsza już została opatentowana. Podobna sytuacja miała wcześniej miejsce np. w przypadku ginkgolidów wyizolowanych z ekstraktu z *Ginkgo biloba* [118]. Aby uniknąć kosztownej izolacji znanych już związków skład surowych ekstraktów ocenia się przy wykorzystaniu metod chromatograficznych i spektroskopowych [119]. Przykładowo niewielką próbkę surowego ekstraktu rozdziela się metodą chromatografii cienkowarstwowej, a wybarwione specjalną mieszaniną wywoływacza składniki ekstrahuje się z adsorbenta polarnym rozpuszczalnikiem. Zarejestrowane dla otrzymanego roztworu widmo spektrofotometryczne poddaje się analizie porównawczej z wcześniej przygotowaną biblioteką widm znanych związków.

Z kolei nowo zidentyfikowana substancja aktywna często występuje w ekstrakcie w ilości niewystarczającej do dalszej ewaluacji jej właściwości farmakologicz-

nych. O ile to możliwe proces izolacji substancji aktywnej należy wówczas powtórzyć w skali technicznej. Jak to już wcześniej oszacował McChesney [120] 50 kg surowego materiału wystarcza do pozyskania około 500 mg aktywnego składnika w postaci nadającej się do użycia w większości biotestów.

Natomiast badania przedkliniczne a później również testy kliniczne wymagają aż 2 kg czystej postaci związku aktywnego, którą można pozyskać wykorzystując do tego celu nawet 200 ton wyjściowego materiału. Przykładowo 12 tysięcy drzew cisa zachodniego (łac. *T. brevifolia*) dostarcza 27 tysięcy ton kory, co wystarcza do izolacji zaledwie 2,5 kg taksolu, związku o udowodnionej aktywności przeciwnowotworowej [121].

Z tego względu należy rozważyć również alternatywne źródła pozyskiwania większych ilości substancji aktywnych. Alternatywne metody pozyskiwania taksolu opierają się na zastosowaniu kultur komórkowych oraz kultur korzeni włośnikowatych [122]. Należy tutaj wspomnieć również o możliwościach wykorzystania metod inżynierii genetycznej, których pełniejsze wykorzystanie pozwoli otrzymywać zadowalające ilości związków aktywnych ze szczepów modyfikowanych genetycznie [123].

PODZIĘKOWANIA

Praca częściowo finansowana w ramach projektu EU-OPENSREEN, European Infrastructure of Open Screening Platforms for Chemical Biology, FP7-INFRASTRUCTURES-2010-1, numer Projektu 261861.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] R. Casey, Designing Chemical Compound Libraries for Drug Discovery, December 1, 2005, [on-line], Business Intelligence Network, dostępny w Internecie: <http://www.b-eye-network.com/view/2039>.
- [2] E.A. Martis, R. Radhakrishnan, R.R. Badve, J. Appl. Pharm. Sci., 2011, **1**, 2.
- [3] H.D. Holtje, W. Sippl, D. Rognan, G. Folkers, *Molecular Modeling – Basic Principles and Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. Weinheim, 2008, 3rd ed.
- [4] a) L.A. Thompson, J.A. Ellman, Chem. Rev., 1996, **96**, 555; b) E.E. Kim, C.T. Baker, M.D. Dwyer, M.A. Murcko, B.G. Rao, R.D. Tung, M.A. Navia, J. Am. Chem. Soc., 1995, **117**, 1181.
- [5] a) M. Paturej, M. El Fray, Polimery, 2009, **54**, 179; b) V. Kholodovych, A.V. Gubskaya, M. Bohrer, N. Harris, D. Knight, J. Kohn, W.J. Welsh, Polymer, 2008, **49**, 2435; c) S. Brocchini, K. James, V. Tangpasuthadol, J. Kohn, J. Biomed. Mater. Res., 1998, **42**, 66; d) C.H. Reynolds, J. Comb. Chem., 1999, **1**, 297.
- [6] a) A. Knappik, L.M. Ge, A. Honegger, P. Pack, M. Fischer, G. Wellenhofer, A. Hoess, J. Wolle, A. Pluckthun, B. Virnekas, J. Mol. Biol., 2000, **296**, 57; b) M. Littre, M. Welschhof, M. Braunagel, L. Hermes, C. Christ, A. Keller, P. Rohrbach, T. Kurschner, S. Schmidt, C. Kleist, P. Terness, J. Immunol. Methods, 1999, **231**, 3; c) K. Charlton, W.J. Harris, A.J. Porter, Biosens. Bioelectron.,

- 2001, **16**, 639; d) C.W. Cobaugh, J.C. Almagro, M. Pogson, B. Iverson, G. Georgiou, J. Mol. Biol., 2008, **378**, 622.
- [7] a) V.J. Hruby, J.-M. Ahn, S. Liao, Curr. Opin. Chem. Biol., 1997, **1**, 114; b) P.J. Schatz, Curr. Opin. Biotechnol., 1994, **5**, 487.
- [8] M. Denault, J.N. Pelletier, Methods Mol. Biol., 2007, **352**, 127.
- [9] a) M. Famulok, A. Jenne, Curr. Opin. Chem. Biol., 1998, **2**, 320; b) E.M. LeProust, B.J. Peck, K. Spirin, H.B. McCuen, B. Moore, E. Namsaraev, M.H. Caruthers, Nucl. Acids Res., 2010, **38**, 2522.
- [10] a) H.S. Zaher, P.J. Unrau, *Methods in Molecular Biology*, v. 288: *Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications*, P. Herdewijn (ed.), Humana Press Inc., b) M.A. Cleary, K. Kilian, Y. Wang, J. Bradshaw, G. Cavet, W. Ge, A. Kulkarni, K. Chang, N. Sheth, E. Leproust, E.M. Coffey, J. Burchar, W.R. McCombie, P. Linsley, G.J. Hannon, Nat. Methods, 2004, **1**, 241.
- [11] S. Rafique, M. Idrees, A. Nasim, H. Akbar, A. Athar, Biotech. Mol. Biol. Rev., 2010, **5**, 38.
- [12] D. Chen, V. Milacic, M. Frezza, Q.P. Dou, Curr. Pharm. Des., 2009, **15**, 777.
- [13] M.S. Arayne, N. Sultana, U. Haroon, M.A. Mesaik, Bioinorg. Chem. Appl., 2009, Article ID 914105.
- [14] V. Badmaev, S. Prakash, M. Majeed, J. Altern. Complement. Med., 1999, **5**, 273.
- [15] a) <http://www.cas.org/cgi-bin/cas/regreport.pl>, b) 63,461,917 związków na dzień 15.01.2012.
- [16] A.D. Gorse, Curr. Top. Med. Chem., 2006, **6**, 3.
- [17] R.S. Bohacek, C. McMartin, W.C. Guida, Med. Res. Rev., 1996, **16**, 3.
- [18] P. Ertl, J. Chem. Inf. Comput. Sci., 2003, **43**, 374.
- [19] a) T. Fink, H. Bruggesser, J.-L. Reymond, Angew. Chem. Int. Ed., 2005, **44**, 1504; b) T. Fink, J.-L. Reymond, J. Chem. Inf. Model., 2007, **47**, 342.
- [20] M. Feher, J. M. Schmidt, J. Chem. Inf. Comput. Sci., 2003, **43**, 218.
- [21] Molinspiration Cheminformatics virtual Screening Toolkit, ver. 2005.03, Molinspiration Cheminformatics: Slovensky Grob, Slovak Republic, 2005.
- [22] L.C. Blum, J.-L. Reymond, J. Am. Chem. Soc., 2009, **131**, 8732.
- [23] J.-L. Reymond, R. van Deursen, L.C. Blum, L. Ruddigkeit, Med. Chem. Commun., 2010, **1**, 30.
- [24] C.A. Lipiński, A. Hopkins, Nature, 2004, **432**, 855.
- [25] G.V. Paolini, R.H. Shapland, W.P. van Hoorn, J.S. Mason, A.L. Hopkins, Nat. Biotechnol., 2006, **24**, 805.
- [26] C.M. Dobson, Nature, 2004, **432**, 824.
- [27] R. Todeschini, V. Consonni, *Handbook of Molecular Descriptors*, Wiley-VCH, Weinheim, 2000.
- [28] J.L. Medina-Franco, K. Martinez-Mayorga, M.A. Giulianotti, R.A. Houghten, C. Pinilla, Curr. Comput.-Aided Drug Des., 2008, **4**, 322.
- [29] T.I. Oprea, J. Gottfries, J. Comb. Chem., 2001, **3**, 157.
- [30] J.-L. Reymond, R. van Deursen, Chem. Med. Chem., 2007, **2**, 636.
- [31] J.-L. Reymond, R. van Deursen, L.C. Blum, L. Ruddigkeit, Med. Chem. Commun., 2010, **1**, 30.
- [32] N. Nikolova, J. Jaworska, QSAR Comb. Sci., 2003, **22**, 1006.
- [33] H. Patel, M.J. Bodkin, B. Chen, V.J. Gillet, J. Chem. Inf. Model., 2009, **49**, 1163.
- [34] a) R. Kurczab, Przemysł Farmaceutyczny, 2011, **5**, 88; b) S. Polak, B. Wiśniowska, Farmacja Polska, 2009, **65**, 214; c) P. Setny, [on-line] dostępny na stronie www, http://www.icm.edu.pl/kdm/Projektowanie_leków.
- [35] U. Schopfer, F. Hohn, M. Hueber, M. Girod, C. Engeloch, M. Popov, I. Muckenschnabel, J. Biomol. Screen., 2007, **12**, 724.
- [36] S. Lane, B. Boughtflower, I. Mutton, C. Paterson, D. Farrant, N. Taylor, Z. Blaxill, C. Carmody, P. Borman, Anal. Chem., 2005, **77**, 4354.
- [37] R. Lucena, S. Cardenas, M. Valcarcel, Anal. Bioanal. Chem., 2007, **388**, 1663.

- [38] K. Oldenburg, D. Pooler, K. Scudder, C. Lipinski, M. Kelly, *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, 2005, **8**, 499.
- [39] F. Li, C. Zhang, X. Guo, W. Feng, *Biomed. Chromatogr.*, 2003, **17**, 96.
- [40] V. Pinciroli, R. Biancardi, N. Colombo, et al. *J. Comb. Chem.*, 2001, **3**, 434.
- [41] A. Dalby, J.G. Nourse, W.D. Hounshell, A.K.I. Gushurst, D.L. Grier, B.A. Leland, J. Laufer, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 1992, **32**, 244.
- [42] G.M. Rishton, *Drug Discov. Today*, 1997, **2**, 382.
- [43] L.M. Mayr, P. Fuerst, *J. Biomol. Screen.*, 2008, **13**, 443.
- [44] D.J. Huggins, A.R. Venkitaraman, D.R. Spring, *ACS Chem. Biol.*, 2011, **6**, 208.
- [45] M.D. Burke, S.L. Schreiber, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, **43**, 46.
- [46] a) R.W. DeSimone, K.S. Currie, S.A. Mitchell, J.W. Darrow, D.A. Pippin, *Comb. Chem. High Throughput Screen*, 2004, **7**, 473; b) C.D. Duarte, E.J. Barreiro, C.A.M. Fraga, *Mini Rev. Med. Chem.*, 2007, **7**, 1108.
- [47] P.L. Myers, J.W. Greene, J. Saunders, S.L. Teig, *Today's Chemist at work*, 1997, **6**, 47.
- [48] D.R. Spring, *Org. Biomol. Chem.*, 2003, **1**, 3867.
- [49] E.J. Corey, X.-M. Cheng, *The logic of Chemical Synthesis*, Wiley, New York, 1995.
- [50] D.H. Drewry, S.S. Young, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 1999, **48**, 1.
- [51] a) L. Tan, E. Loukine, J. Bajorath, *J. Chem. Inf. Model.*, 2008, **48**, 2308; b) Z. Deng, C. Chuaqui, J. Singh, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 490.
- [52] a) D.E. Goldberg, *Algorytmy genetyczne i ich zastosowania*, Warszawa, WNT, 1998; b) A.L. Parrill, *Drug Discov. Today*, 1996, **1**, 514.
- [53] L. Weber, S. Wallbaum, C. Broger, K. Gubernator, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1995, **34**, 2280.
- [54] a) O. Prien, *ChemBioChem.*, 2005, **6**, 500; b) G. Muller, *Drug Discov. Today*, 2003, **8**, 681.
- [55] R.L. Rice, J.M. Rusnak, F. Yokokawa, S. Yokokawa, D.J. Messner, A.L. Boynton, P. Wipf, J.S. Lazo, *Biochemistry*, 1997, **36**, 15965.
- [56] B.E. Evans, K.E. Rittle, M.G. Bock, R.M. DiPardo, R.M. Freidinger, W.L. Whitter, G.F. Lundell, D.F. Veber, P.S. Anderson, *J. Med. Chem.*, 1988, **31**, 2235.
- [57] a) M.E. Welsch, S.A. Synder, B.R. Stockwell, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2010, **14**, 347; b) R.W. DeSimone, K.S. Currie, S.A. Mitchell, J.W. Darrow, D.A. Pippin, *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, 2004, **7**, 473.
- [58] M.M. Olah, C.G. Bologna, T.I. Oprea, *Curr. Drug. Discov. Technol.*, 2004, **1**, 211.
- [59] M. Olah, M. Mracec, L. Ostopovivi, R. Rad, A. Bora, N. Hadaruga, L. Olah, M. Banda, Z. Simon, M. Mracec, T.I. Oprea, *Cheminformatics in Drug Discovery*, T.L. Oprea, Ed.; Wiley-VCH: New York, 2004, 223.
- [60] E.A. Coats, *3D QSAR in Drug Design*, Vol. 3, H. Kubinyi, G. Folkers, Y. C. Martin, Eds., Kluwer/ ESCOM, Dordrecht, 1998, str. 199.
- [61] a) D. Weininger, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 1988, **28**, 31; b) D. Weininger, A. Weininger, J.L. Weininger, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 1989, **29**, 97.
- [62] a) O. Roche, P. Schneider, J. Zuegge, W. Guba, M. Kansy, A. Alanine, K. Bleicher, F. Danel, E.M. Gutknecht, M. Rogers-Evans, W. Neidhart, H. Stalder, M. Dillon, E. Sjogren, N. Fotouhi, P. Gillespie, R. Goodnow, W. Harris, P. Jones, M. Taniguchi, S. Tsujii, W. von der Saal, G. Zimmermann, G. Schneider, *J. Med. Chem.*, 2002, **45**, 137; b) S.L. McGovern, E. Caselli, N. Grigorieff, B.K. Shoichet, *J. Med. Chem.*, 2002, **45**, 1712; c) R.P. Sheridan, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 2003, **43**, 1037.
- [63] a) H. van De Waterbeemd, D.A. Smith, K. Beaumont, D.K. Walter, *J. Med. Chem.*, 2001, **44**, 1313; b) D.F. Veber, S.R. Johnson, H.Y. Cheng, B.R. Smith, K.W. Ward, K.D. Kopple, *J. Med. Chem.*, 2002, **45**, 2615.

- [64] a) J. Ashby, D. Paton, *Mutation Res.*, 1993, **286**, 3; b) N. Green, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2002, **54**, 417.
- [65] a) P.S. Charifson, W.P. Walters, *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 2002, **16**, 311; b) M. Hann, B. Hudson, X. Lewell, R. Lifely, L. Miller, N. Ramsden, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 1999, **39**, 897.
- [66] a) T.I. Oprea, *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 2000, **14**, 251; b) S. Sirois, G. Hatzakis, D. Wei, Q. Du, K.-Ch. Chou, *Comput. Biol. Chem.*, 2005, **29**, 55; c) G.M. Rishton, *Drug. Disc. Today*, 1997, **2**, 382.
- [67] a) R.C. Onderwater, J.N. Commandeur, E.J. Groot, A. Sitters, W.M. Menge, N.P. Vermeulen, *Toxicology*, 1998, **125**, 117; b) G.F. Smith., *Prog. Med. Chem.*, 2011, **50**, 1.
- [68] FILTER OpenEye Scientific Software, <http://zinc.docking.org>
- [69] *Chemia leków*, Ewaryst Pawełczyk (ed.), Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1978, str. 557.
- [70] H. Xu, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2002, **2**, 1305.
- [71] a) E. Estrada, E. Uriarte, *Curr. Med. Chem.*, 2001, **8**, 1573; b) S. Fergus, A. Bender, D.R. Spring, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2005, **9**, 304.
- [72] a) R. Todeschini, V. Consonni, *Handbook of Molecular Descriptors*, WILEY-VCH, 2000; b) R. Todeschini, V. Consonni, *Molecular Descriptors for Chemoinformatics* (2 volumes), Wiley-VCH, 2009; c) C. Bologna, T. K. Allu, M.Olah, M. A. Kappler, T. I. Oprea, *J. Comput. Aided Mol. Des.* 2005, **19**, 625; d) V.J. Sykora, D.E. Leahy, *J. Chem. Inf. Model.*, 2008, **48**, 1931.
- [73] E.J. Martin, J.M. Blaney, M.A. Siani, D.C. Spellmeyer, A.K. Wong, W.H. Moos, *J. Med. Chem.*, 1995, **38**, 1431.
- [74] a) M. Hahn, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 1997, **37**, 80; b) S. Renner, G. Schneider, *Chem. Med. Chem.*, 2006, **1**, 181.
- [75] a) S. Nikolić, N. Trinajstić, I.M. Tolić, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 2000, **40**, 920; b) R.J. Spandl, A. Bender, D.R. Spring, *Org. Biomol. Chem.*, 2008, **6**, 1149.
- [76] A.L. Hopkins, J.S. Mason, J.P. Overington, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2006, **16**, 127.
- [77] I. Kola, J. Landis, *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 2004, **3**, 711.
- [78] a) C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1997, **23**, 3; b) C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2001, **46**, 3.
- [79] C.A. Lipiński, *Drug Discov. Today: Technologies*, 2004, **1**, 337.
- [80] D.E. Clark, S.D. Pickett., *Drug Discov. Today*, 2000, **5**, 49.
- [81] D.F. Veber, S.R. Johnson, H.Y. Cheng, B.R. Smith, K.W. Ward, K.D. Kopple, *J. Med. Chem.*, 2002, **45**, 2615.
- [82] J. Clardy, C. Walsh., *Nature*, 2004, **432**, 829.
- [83] T.I. Oprea, *Mol. Divers.*, 2002, **5**, 199.
- [84] a) T.H. Keller, A. Pichota, Z. Yin, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2006, **10**, 357; b) T. Fichert, M. Yazdani, J.R. Proudfoot, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, **13**, 719; c) I. Muegge, *Med. Res. Rev.*, 2003, **23**, 302; d) M.C. Wenlock, R.P. Austin, P. Barton, A.M. Davis, P.D. Leeson, *J. Med. Chem.*, 2003, **46**, 1250.
- [85] A. Luch, *The Carcinogenic Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, 2005, Imperial College Press.
- [86] K. Muller, Ch. Faeh, F. Diederich, *Science*, 2007, **317**, 1881.
- [87] a) D.C. Rees, M.S. Congreve, C.W. Murray, R. Carr., *Nat Rev. Drug Discov.*, 2004, **3**, 660; b) D.A. Erlanson, R.S. McDowell, T. O'Brien, *J. Med. Chem.*, 2004, **47**, 3463.
- [88] a) M. Congreve, R. Carr, C. Murray, H. A. Jhoti, *Drug Discov. Today*, 2003, **8**, 876; b) M. Cherry, T. Mitchell, *Introduction to Fragment-Based Drug Discovery*, [w:] *Fragment-Based Drug Discovery: A Practical Approach*, 2008, John Wiley&Sons, Ltd., rozdział 1.
- [89] A.L. Hopkins, C.R. Groom, A. Alex, *Drug Discov. Today*, 2004, **9**, 430.

- [90] C. Abad-Zapatero, J.T. Metz, *Drug Discov. Today*, 2005, **10**, 464.
- [91] J. Baker, T. Hestekamp, D. Whittaker, *Drug Discov. World.*, 2008, **3**, 67.
- [92] a) L. Di, E.H. Kerns, *Drug Discov. Today*, 2006, **11**, 446; b) A. Schuffenhauer, S. Ruedisser, A.L. Marzinzik, W. Jahnke, M.J. Blommers, P. Selzer, E. Jacoby, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2005, **5**, 751.
- [93] M. Hohwy, L. Spadola, B. Lundquist, P. Hawtin, J. Dahmen, I. Groth-Clausen, E. Nilsson, S. Persdotter, K. von Wachenfeldt, R.H.A. Folmer, K. Edman, *J. Med. Chem.*, 2008, **51**, 2178.
- [94] P.J. Hajduk, R.P. Meadows, S.W. Fesik, *Science*, 1997, **278**, 497.
- [95] G.W. Bemis, M.A. Murcko, *J. Med. Chem.*, 1996, **39**, 2887.
- [96] G.W. Bemis, M.A. Murcko, *J. Med. Chem.*, 1999, **42**, 5095.
- [97] a) J. Fejzo, C.A. Lepre, J.W. Peng, G.W. Bemis, Ajay, M.A. Murcko, J.M. Moore, *Chem. Biol.*, 1999, **6**, 755; b) C.A. Lepre, J. Peng, J. Fejzo, N. Abdul-Manan, J. Pocas, M. Jacobs, X. Xie, J.M. Moore, *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, 2002, **5**, 583.
- [98] X. Q. Lewell, D.B. Judd, S.P. Watson, M.M. Hann, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 1998, **38**, 511.
- [99] K. Babaoglu, B.K. Shoichet, *Nat. Chem. Biol.*, 2006, **2**, 720.
- [100] A. Schuffenhauer, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2005, **5**, 751.
- [101] a) J.C. Priscu, C.H. Fritsen, E.E. Adams, S.J. Giovannoni, H.W. Paerl, C.P. McKay, P.T. Doran, D.A. Gordon, B.D. Lanoil, J.L. Pinckney, *Science*, 1998, **280**, 2095; b) J.T. Staley, J.J. Gosink, *Annu. Rev. Microbiol.*, 1999, **53**, 189.
- [102] a) E. Blochl, R. Rachel, S. Burggraf, D. Hafenbradl, H.W. Jannasch, K.O. Stetter, *Extremophiles*, 1997, **1**, 14; b) H. Takami, K. Kobata, T. Nagahama, H. Kobayashi, A. Inoue, K. Horikoshi, *Extremophiles*, 1999, **3**, 97.
- [103] L. Groth, P. Schumann, B. Schuetze, K. Augsten, I. Kramer, E. Stackebrandt, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1999, **49**, 1733.
- [104] S.L. Pimm, G.J. Russell, J.L. Gittleman, T.M. Brooks, *Science*, 1995, **269**, 347.
- [105] R. Vapoorte., *Drug Discov. Today*, 1998, **3**, 232.
- [106] a) A. Sittenfeld, R. Villers, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1993, **4**, 280; b) B. M. Olivera, C. Walker, G.E. Cartier, D. Hooper, A.D. Santos, R. Schoenfeld, R. Shetty, M. Watkins, P. Bandyopadhyay, D.R. Hillyard, *Ann. New York Acad. Sci.*, 1999, **870**, 223.
- [107] a) R. Verpoorte, *J. Pharm. Pharmacol.*, 2000, **52**, 253; b) J. D. Phillipson, L.A. Anderson, *J. Ethnopharmacol.*, 1989, **25**, 61; c) A.D. Kinghorn, *Biotechnology*, 1994, **26**, 81.
- [108] E. Williamson, D.T. Okpako, F.J. Evans, *Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material*, 1996, Wiley, Chichester.
- [109] S.M. Rates, *Toxicol.*, 2001, **39**, 603.
- [110] M. Zhu, J.D. Phillipson, P.M. Greengrass, N.E. Bowery, Y. Cai, *Phytochemistry*, 1999, **44**, 441.
- [111] M.S. Butler, *J. Nat. Prod.*, 2004, **67**, 2141.
- [112] R. Verpoorte, *J. Ethnopharmacol.*, 1989, **25**, 43.
- [113] E.M. Williamson, *Phytomedicine*, 2001, **8**, 401.
- [114] B. Gilbert, L.F. Alves, *Curr. Med. Chem.*, 2003, **10**, 13.
- [115] M. Hamburger, K. Hostettmann, *Phytochem.*, 1991, **30**, 12, 3864.
- [116] P.A. Keifer, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2003, **7**, 388.
- [117] a) N. Bross-Walch, T. Kuhn, D. Moskau, O. Zerbe, *Chem. Biodiversity*, 2005, **2**, 147; b) G.E. Martin, R.C. Crouch, *Two-Dimensional NMR Spectroscopy: Applications for Chemists and Biochemists*, R.M.K. Carlton, W.R. Croasmun (eds.), 1994, Wiley-VCH, Weinheim.
- [118] a) *Ginkgo Biloba*, T.A. van Beek (ed.), 2000, Amsterdam, Harwood Academic Publ.; b) S. Furukawa, *Scientific Papers of the Institute of Physical and Chemical Research, Tokio*, 1932, **19**, 27.
- [119] a) K. Ingkaninan, A. Hazekamp, A.C. Hoek, S. Balconi, R. Verpoorte, *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.* 2000, **23**, 2195; b) G.A. Cordell, Y.G. Shin, *Pure Appl. Chem.*, 1999, **71** 1089;

-
- [120] J.D. McChesney, *Chemistry of the Amazon, Biodiversity, Nature Products and Environmental Issues*, ACS Symposium Series No. 88 American Chemical Society, Washington, DC, 1995.
- [121] M. Wani, H. Taylor, M. Wall, P. Coggon, A. McPhail, *J. Am. Chem. Soc.*, 1971, **93**, 2325.
- [122] Ł. Szoka, *Gazeta Farmaceutyczna*, 2009, **9**, 34.
- [123] a) C.T. Walsh, *Science*, 2004, **303**, 1805; b) J. Lau, S. Frykman, R. Regentin, S. Ou, H. Tsuruta, P. Licari, *Biotechnol. Bioeng.*, 2002, **78**, 280.

Praca wpłynęła do Redakcji 11 czerwca 2012

**PROJEKT AVOGADRO (IAC)
I REDEFINICJA JEDNOSTKI LICZNOŚCI MATERII**

**AVOGADRO PROJECT (IAC)
AND REDEFINITION OF THE MOLE**

W. T. Chyla

*Applied Science Enterprise, P. O. Box 22, 00-975 Warszawa 12
e-mail: chylawt@wp.pl*

Abstract

Wstęp

1. Pojęcie mola i jego związek z kilogramem w układzie SI
2. Właściwości atomów i stałe fizyczne jako wzorcowe wartości odniesienia
3. Geneza projektu Avogadro
4. Zasada pomiaru w projekcie Avogadro i sposób redefinicji mola
5. Techniczny aspekt realizacji projektu Avogadro
6. Kwestia rozbieżności wyników projektu Avogadro i projektu wagi Watta
7. Obecny stan projektu Avogadro i perspektywa finalizacji redefinicji mola

Podsumowanie i dyskusja

Piśmiennictwo cytowane



W. T. Chyla ukończył magisterskie studia chemiczne na Uniwersytecie Warszawskim (chemia kwantowa), a studia fizyczne na University of Southern California, Los Angeles (Master of Arts in Physics). Stopień Philosophy Doctor uzyskał na University of North Texas, Denton (fizyka teoretyczna i fizyka ciała stałego). Studia podyplomowe odbył w United States Particle Accelerator School (Harvard 1990, University of Illinois at Urbana-Champaign 1991, Stanford 1992, Harvard 1993). Pracował m.in. w Instytucie Fizyki PAN jako asystent, w University of Southern California jako asystent (*teaching assistant*), w University of North Texas jako asystent i wykładowca (*teaching fellow*), w Wyższej Szkole Pedagogicznej (obecnie Uniwersytet Warmińsko-Mazurski) jako adiunkt, w Głównym Urzędzie Miar jako główny specjalista oraz kilkanaście lat w sektorze prywatnym. Publikacje z zakresu fizyki teoretycznej, fizyki półprzewodników, optyki, elektrodynamiki kwantowej, oddziaływań kwarków, szczególnej i ogólnej teorii względności oraz metrologii.

ABSTRACT

The paper presents the International Avogadro Coordination (IAC) and the problem of redefinition of the unit of amount of substance (the mole) in the context of a comprehensive reform of the international system of units (SI) that is expected to conclude in a few years. The redefinition program, known as the New SI or the Quantum SI, draws on Maxwell's concept of replacing artifact standards with atomic standards, which are considered stable and available – at least in principle – to everybody, everywhere and at any time; the idea has been generalized and the present tendency is to define base units in terms of physical constants. Redefinition of the mole is a spin-off project associated with redefinition of the kilogram; two high-purity, ^{28}Si -enriched silicon spheres were manufactured to make possible very accurate measurements of their parameters in order to determine (“count”) the number of silicon atoms in each of the two spheres. Initially, the project has been designed to determine the Avogadro constant, with the intent to redefine the kilogram as the mass of an exactly specified number of atoms. Once the consensus had been reached that the kilogram should be defined by fixing the numerical value of the Planck constant and the unit of mass should be realized with the use of the watt balance, the Avogadro project of silicon spheres was reinterpreted and became the basis for the redefinition and realization of the mole. In this paper, I discuss the origins of the Avogadro project (IAC), the physical principle of a very accurate measurement of the Avogadro constant and technical details of the realization of that project. The problem of resolving the discrepancy between results of the IAC and the watt balance project is reviewed. The current status of the IAC is discussed and difficulties with the proposed wording of the New SI redefinition of the mole are indicated. It is expected that all the technical problems can be resolved before the next meeting of the CGPM, where voting on implementation of the New SI is expected.

Keywords: Chemical metrology, amount of substance, redefinition of the mole, Avogadro project, International Avogadro Coordination, IAC, New SI, Quantum SI, AF-SI

Słowa kluczowe: Metrologia chemiczna, liczność materii, redefinicja mola, projekt Avogadro, International Avogadro Coordination, IAC, Nowy SI, Kwantowy SI, AF-SI

WSTĘP

Międzynarodowy układ jednostek miar został wprowadzony na mocy Konwencji Metrycznej podpisanej w dniu 20 maja 1875 r. w Paryżu przez 17 państw przodujących wówczas w dziedzinie nauki, gospodarki i polityki [1–4]. Na mocy owej konwencji ustanowiono międzynarodowy wzorzec jednostki masy (ang. *International Prototype of the Kilogram*, IPK) oraz międzynarodowy wzorzec jednostki długości (ang. *International Prototype of the Metre*, IPM) w postaci platynowo-irydowych artefaktów, powołując równocześnie Międzynarodowe Biuro Miar (fr. *Bureau International des Poids et Mesures*, BIPM) z siedzibą w Sèvres, którego zadaniem było przechowywanie międzynarodowych wzorców (prototypów) kilograma i metra oraz wykonywanie wzorcowań na potrzeby krajów-sygnatariuszy Konwencji Metrycznej; zakres odpowiedzialności BIPM implikuje potrzebę prowadzenia badań w dziedzinie metrycznego układu jednostek miar, tak aby owym zadaniom można było sprostać. Przygotowanie nowych wzorców masy i długości zakończyło się na przełomie 1879 i 1880 r., ale procedura stanowienia wzorców międzynarodowego układu metrycznego została sfinalizowana dopiero w 1889 r. na mocy decyzji pierwszej Generalnej Konferencji Miar (fr. *Conférence Générale des Poids et Mesures*, CGPM), która zatwierdziła całość tego procesu.

Konwencja Metryczna nie dotyczyła ówczesnej jednostki czasu (sekundy, zdefiniowanej jako $1/86400$ część średniej doby słonecznej), ponieważ definicja ta nie budziła kontrowersji i była na owe czasy wystarczająco dokładna. Przedmiotem Konwencji Metrycznej nie były także jednostki elektryczne, chociaż już od dawna prowadzono ilościowe pomiary elektryczne i magnetyczne: prawo Coulomba jest datowane na 1785 r., pełną klasyczną teorię pola elektromagnetycznego opracował J.C. Maxwell w 1865 r., a na rok przed podpisaniem Konwencji Metrycznej, w 1874 r., w Imperium Brytyjskim zatwierdzono pierwszy spójny układ jednostek elektrycznych, oparty na jednostkach mechanicznych, tj. jednostkach długości, masy i czasu (centymetrze, gramie i sekundzie, stąd nazwa – układ cgs). Ustanowienie takiego systemu jednostek elektrycznych było zgodne z ówczesną tendencją do poszukiwania mechanicznego wyjaśnienia wszystkich zjawisk fizycznych, skąd wypływało (błędne) przekonanie o możliwości wyrażania wszelkich wielkości fizycznych za pomocą trzech jednostek mechanicznych.

Metrologia jest nauką koncentrującą się na dokładności, której pośpiech nie służy; poza tym, do wprowadzenia formalnych zmian w układzie jednostek metrycznych wymagany jest consensus wielu krajów. Upłynęło zatem kilkadziesiąt lat zanim zdecydowano się wprowadzić do układu metrycznego MKS (akronim wywodzącym się od metra, kilograma i sekundy) nowe jednostki podstawowe. Dopiero 9. Generalna Konferencja Miar w 1948 r. podjęła rezolucję o włączeniu do układu metrycznego jednostki natężenia prądu elektrycznego, ampera (A), przyjmując elektromagnetyczną definicję tej jednostki; od tamtej pory układ metryczny oznaczany był akronimem MKSA. Na tej samej, 9. konferencji CGPM przyjęto definicję jednostki światłości, nazwanej kandelą (cd). Jednostkę temperatury termodynamicznej, kel-

wina (K), zdefiniowano i włączono do układu metrycznego jako jednostkę podstawową decyzją 10. konferencji CGPM w 1954 r. Również jednostka czasu, sekunda, została wówczas objęta zakresem odpowiedzialności Konwencji Metrycznej.

Na 11. konferencji CGPM w 1960 r. dokonano kilku istotnych zmian w metrycznym układzie jednostek miar, a przede wszystkim zredefiniowano metr za pomocą długości fali promieniowania emitowanego przez lampę kryptonową (eliminując w ten sposób metrową platynowo-irydową sztabę przechowywaną w BIPM jako pierwotny wzorzec metra) oraz zmodyfikowano astronomiczną definicję sekundy, włączając ją formalnie do zbioru sześciu jednostek podstawowych układu metrycznego (metr, kilogram, sekunda, amper, kelwin i kandela). Zreformowany układ metryczny nazwano *Système International d'Unités* (Międzynarodowy Układ Jednostek Miar); zazwyczaj jest on oznaczany akronimem SI.

Jednostka liczności materii, mol (symbol: mol), jest „najmłodszą” jednostką podstawową układu SI, bowiem zdefiniowano ją i włączono do SI na 14. konferencji CGPM w 1971 r. Od tamtej pory, czyli przez ostatnich 40 lat, zbiór 7. podstawowych jednostek SI pozostał niezmienny, chociaż definicje i *mise en pratique* (metody realizacji) jednostek podstawowych podlegały modyfikacjom i doprecyzowaniu w miarę postępu naukowego i rosnących wymagań technicznych.

W rozdziale 1. omówimy związek mola z kilogramem; związek obu jednostek implikuje, iż redefinicja kilograma powinna iść w parze z redefinicją mola i ewentualnie innych jednostek podstawowych zależnych od kilograma w układzie SI. Rozdział 2. przedstawia motywację odchodzenia od definicji jednostek za pomocą umownych artefaktów wzorcowych na rzecz definicyjnych wzorców atomowych oraz definicji polegających na ustaleniu wartości stałych fizycznych; te dwie ostatnie metody, jako dość abstrakcyjne, wymagają określenia sposobu praktycznej realizacji tak zdefiniowanych jednostek miar, czyli określenia ich *mise en pratique*. W rozdziale 3. zajmiemy się genezą projektu Avogadro (ang. *International Avogadro Coordination*, IAC), który początkowo pomyślany był jako jeden z dwu możliwych sposobów zredefiniowania kilograma, a później wykorzystany został do zredefiniowania mola. W dwu następnych rozdziałach (4 i 5) przedyskutujemy podstawy fizyczne oraz kwestie techniczne realizacji projektu IAC. Rozbieżność pomiędzy wynikami projektu Avogadro, a wynikami projektu wagi Watta (jest to konkurencyjne podejście do zagadnienia redefinicji i realizacji kilograma) oraz rozwiązanie tego problemu przedstawia rozdział 6. Aktualny stan zaawansowania programu IAC oraz perspektywy redefinicji mola za ok. 3 lata omówione są w rozdziale 7. Artykuł kończy krótkie podsumowanie zawierające uwagi natury ogólnej.

1. POJĘCIE MOLA I JEGO ZWIĄZEK Z KILOGRAMEM W UKŁADZIE SI

Oficjalna międzynarodowa definicja mola z 1971 r. stwierdza, że: „*The mole is the amount of substance of a system which contains as many elementary entities as there are atoms in 0.012 kilogram of carbon 12; its symbol is 'mol'. When the mole is used, the elementary entities must be specified and may be atoms, molecules, ions, electrons, other particles, or specified groups of such particles.*” (rozdz. 2.1.1.6 w [5]). Polska wersja tej definicji brzmi: „*Mol jest to liczność materii układu zawierającego liczbę cząstek równą liczbie atomów w masie 0,012 kilograma węgla 12. Przy stosowaniu mola należy określić rodzaj cząstek, którymi mogą być: atomy, cząsteczki, jony, elektrony, inne cząstki lub określone zespoły takich cząstek*” [6].

Współczesne pojęcie mola i sposób jego zdefiniowania (określona masa danej substancji wyrażona w gramach) wywodzi się z prawa stosunków wielokrotnych (J. Dalton, 1804). Dziedzictwo teorii atomistycznej Daltona oraz pragmatyzm chemików sprawił, iż adepci tej nauki posługiwali się pojęciem gramoatomu, gramo-cząsteczki czy kilku rodzajami równoważników chemicznych na długo przed eksperymentalnym potwierdzeniem istnienia atomów na poziomie zadowalającym fizyków: pomimo wielkich sukcesów teorii atomowej w wyjaśnianiu reakcji chemicznych, praw gazów doskonałych (J. Maxwell, 1866), czy teorii roztworów elektrolitów (S. Arrhenius, 1887), istnienie atomów, cząsteczek i jonów przestało być kwestionowane dopiero po odkryciu elektronu przez J.J. Thomsona (1897) i jądra atomowego przez E. Rutherforda (1909).

Chociaż przedmiot zainteresowań oraz metody pracy chemików i fizyków w pewnym stopniu pokrywają się, to obie te grupy badaczy na ogół pracują niezależnie i mają inny punkt widzenia na to samo zagadnienie. Tak było w przypadku (względnych) mas atomowych, a w konsekwencji również mas molowych. Chemiccy odnosili masy atomowe i cząsteczkowe do 1/16 masy atomowej tlenu występującego naturalnie w przyrodzie, czyli do średniej ważonej mieszaniny trwałych izotopów tlenu: ^{16}O (99,760%), ^{17}O (0,039%) i ^{18}O (0,201%). Natomiast fizycy argumentowali, iż taka uśredniona masa atomowa nie odpowiada żadnemu faktycznie występującemu w przyrodzie obiektowi, że skład izotopowy tlenu może się nieco zmieniać w zależności od pochodzenia próbki, i dlatego mierzyli masy atomowe względem czystego izotopu ^{16}O , wydzielonego z naturalnej mieszaniny izotopów tlenu metodami spektrometrii masowej. Różnica w wyborze atomowej masy odniesienia powodowała, iż względne masy atomowe (a tym samym i masy molowe) wyznaczone przez chemików i fizyków różniły się na 5 cyfrze znaczącej, prowadząc do niespójności danych pochodzących z różnych źródeł (zauważmy, że najdokładniejsze współczesne pomiary względnych mas atomowych niektórych¹ izotopów, np. ^{16}O względem ^{12}C , osiągają dokładność rzędu 11 cyfr znaczących [7]).

1 Nie mówimy tu o względnych masach atomowych niektórych izotopów krótkożyjących, które są mierzone ze znacznie mniejszą dokładnością.

Decyzje CGPM mają charakter prawny, są podejmowane na zasadzie consensusu i obowiązują wszystkich sygnatariuszy Konwencji Metrycznej. Dlatego proponowane modyfikacje układu jednostek metrycznych są przyjmowane przez CGPM dopiero wówczas, gdy wszystkie merytorycznie kompetentne strony uzgodnią swe stanowisko i zostanie ono potwierdzone przez Międzynarodowy Komitet Miar (fr. *Comité International des Poids et Mesures*, CIPM) w formie odpowiedniej rekomendacji. Międzynarodowe reprezentacje chemików (ang. *International Union of Pure and Applied Chemistry*, IUPAC) i fizyków (ang. *International Union of Pure and Applied Physics*, IUPAP) uzgodniły wspólne stanowisko w kwestii pomiaru względnych mas atomowych w latach 1959–1960. Kompromis polegał na tym, by przyjąć – na mocy definicji – masę atomową izotopu węgla ^{12}C za równą dokładnie 12 jednostkom masy atomowej, a tym samym (względne) masy atomowe i cząsteczkowe wyrażać w stosunku do 1/12 masy izotopu ^{12}C . Porozumienie to zostało zaakceptowane przez Międzynarodową Organizację Normalizacyjną (ang. *International Standardization Organization*, ISO), po czym stało się przedmiotem obrad CIPM, który w 1967 r. sformułował (jeszcze nieoficjalną) definicję mola jako licznosc materii, która zawiera tyle samo cząstek danego rodzaju, co 12 gramów czystego izotopu węgla ^{12}C . Definicja ta dojrzewała jeszcze przez 2 lata, po czym CIPM na posiedzeniu w 1969 r. przygotował odpowiednią rekomendację dla CGPM, zgodnie z którą 14. konferencja CGPM w 1971 r. na mocy Rezolucji 3 zatwierdziła zarekomendowaną definicję jednostki licznosci materii i nadała molowi status jednostki podstawowej układu SI [8].

Ponieważ definicja mola odwołuje się bezpośrednio do jednostki masy, wartość mola zależy od wartości kilograma. Niektóre inne jednostki podstawowe układu SI (np. amper) również zależą od wartości kilograma i jakkolwiek zmiana wartości jednostki masy implikuje zmianę wartości jednostek związanych z kilogramem. Jednostka masy jest, co prawda, przyjmowana za stałą na mocy definicji, ale jest to tylko kwestia umowy niezgodnej ze stanem faktycznym, co wiadomo na podstawie znajomości procesów zachodzących na powierzchni definicyjnego wzorca masy (np. adsorpcja fizyczna, reakcje chemiczne, wpływ czyszczenia IPK na jego masę) oraz w bryle wzorca masy (np. reakcje jądrowe pod wpływem czynników zewnętrznych i wewnętrznych); zostało to potwierdzone pomiarami porównawczymi platynowo-irydowych wzorców kilograma, które wykazują mierzalny dryft masy. Co prawda, zaobserwowana wartość dryftu tych artefaktów jest niewielka (nie przekracza $7,5 \times 10^{-8}$ kg na stulecie [2]), ale (1) wiele pomiarów na najwyższym poziomie metrologicznym charakteryzuje się obecnie znacznie mniejszą niepewnością względną (np. 2×10^{-9} w przypadku pomiaru masy, a nawet $\sim 10^{-16}$ w przypadku pomiarów czasu); (2) dryft masy pierwotnego wzorca kilograma (IPK) jest niekontrolowalny (można go jedynie szacować przez porównanie z innymi platynowo-irydowymi wzorcami); (3) dryft masy IPK powoduje niekontrolowalny dryft wartości jednostek podstawowych SI związanych z kilogramem, np. mola.

Prace badawcze prowadzone w związku z programem redefinicji jednostki masy [9–10] doprowadziły do wniosku, że nie można ograniczyć się do redefinicji kilograma, ale niezbędna jest kompleksowa reforma układu SI, której głównym punktem powinna być jednoczesna redefinicja czterech jednostek podstawowych układu metrycznego (kilograma, ampera, kelwina i mola) za pomocą stałych fizycznych (stałej Plancka h , ładunku elementarnego e , stałej Boltzmannna k_B i stałej Avogadro N_A). Pogląd ten został zaakceptowany przez CIPM (Rekomendacja 1, CI-2005, [11]), a następnie proponenci redefinicji wywodzący się z BIPM, NIST i NPL przedstawili programowy artykuł na temat reformy układu jednostek SI [12].

2. WŁAŚCIWOŚCI ATOMÓW I STAŁE FIZYCZNE JAKO WZORCOWE WARTOŚCI ODNIESIENIA

Kilka lat przed podpisaniem Konwencji Metrycznej, J.C. Maxwell zauważył, że podstawowe jednostki miar nie powinny być definiowane za pomocą arbitralnie wybranych artefaktów lub innych wielkości, które mogą ulegać zmianom wraz z upływem czasu, a dotyczy to zarówno kilograma i metra, jak i sekundy (kilogram i metr były wówczas jednostkami obowiązującymi tylko na terytorium Francji). Maxwell zaproponował (1870 r.), aby oprzeć układ jednostek miar na właściwościach atomów, ponieważ ich charakterystyki fizyczne uważał za obiektywnie niezmiennie [13]. Propozycja ta znacznie wyprzedziła swój czas, ponieważ nie było wówczas technicznych możliwości jej zrealizowania.

Koncepcja oparcia podstawowych jednostek miar na właściwościach atomów została oficjalnie wdrożona po raz pierwszy dopiero w roku 1960, gdy w układzie SI jednostkę długości (metr) zdefiniowano i zrealizowano za pomocą długości fali linii spektralnej emitowanej przez lampę kryptonową (^{86}Kr) [14]; definicja ta została zmieniona w 1983 r. W obecnie obowiązującym układzie SI wzorzec atomowy definiuje jednostkę czasu: na przełomie roku 1967 i 1968, na 13. konferencji CGPM zatwierdzono redefinicję i realizację sekundy za pomocą częstotliwości przejścia nadsubtelnego w atomie ^{133}Cs [15].

Budowa pierwszego lasera rubinowego przez T.H. Maimana w 1960 r. [16] i szybki rozwój tej dziedziny wiedzy umożliwił bardzo dokładny pomiar szybkości światła, co doprowadziło do kolejnej redefinicji jednostki długości. W roku 1983, decyzją 17. konferencji CGPM, metr został zdefiniowany jako droga przebyta przez światło w próżni w określonym przedziale czasu; na mocy tej definicji ustalona została dokładna wartość szybkości światła w próżni, c [17].

Międzynarodowy wzorzec kilograma (IPK) jest jednocześnie artefaktem definicyjnym i pierwotną *realizacją* kilograma. Natomiast definicja jednostki miary za pomocą właściwości fizycznych atomu wymaga sprecyzowania również sposobu realizacji tej jednostki i warunków jej odtwarzania w praktyce laboratoryjnej. Definicja jednostki miary poprzez ustalenie wartości pewnej stałej fizycznej ma jeszcze bardziej abstrakcyjny charakter niż odwoływanie się do właściwości atomów, i tym

bardziej wymaga określenia sposobu realizacji tak zdefiniowanej jednostki. Obie te metody definiowania jednostek miar implikują rozróżnienie między *definicją* a *realizacją* danej jednostki; każdej definicji opartej na właściwości atomów danego rodzaju lub na wartości stałej fizycznej musi zatem towarzyszyć „*mise en pratique*” (zalecany sposób realizacji jednostki miary) jako jej nieodzowne uzupełnienie.

3. GENEZA PROJEKTU AVOGADRO

Projekt Avogadro i redefinicja mola są konsekwencją prac nad redefinicją kilograma. Redefinicję jednostki masy można przeprowadzić dwiema niezależnymi metodami: (1) poprzez ustalenie wartości liczbowej stałej Plancka h , realizując kilogram za pomocą tzw. wagi Watta [18–22], lub (2) poprzez ustalenie wartości liczbowej stałej Avogadro N_A , co pozwala zdefiniować kilogram jako masę ustalonej liczby ($10^3 \times N_A \times \text{mol}/12$) atomów węgla ^{12}C ; w praktyce, realizacją jednostki masy jest wówczas kryształ o znanej liczbie atomów danego rodzaju (np. monokryształ krzemu ^{28}Si) [9, 10, 23–26]. Wybór sposobu redefinicji kilograma wpłynie na wartość jednostek związanych z kilogramem, zarówno tych należących do SI (mol, amper, kandela), jak i nienależących do SI, ale dopuszczonych do stosowania w specjalnych obszarach tematycznych, takich jak jednostka masy atomowej (u), czyli dalton (Da) [27–29].

Ta druga metoda wywodzi się z pomysłu przedstawionego w roku 1963 przez C. Egidi, który rozważał definicję i realizację jednostki masy w postaci monokryształu (np. germanu) [30]. Wdrożenie tego pomysłu umożliwił postęp w technologii wytwarzania monokryształów krzemu dla potrzeb przemysłu elektronicznego oraz rozwój interferometrii optycznej i rentgenowskiej, pozwalający mierzyć stałe sieciowe kryształów z wielką dokładnością [31–33]. Pełną koncepcję projektu Avogadro, znanego dziś pod nazwą *International Avogadro Coordination*, IAC, przedstawił G. Zosi w 1983 r. [34].

Generalna Konferencja Miar (CGPM) zajęła oficjalne stanowisko w kwestii redefinicji kilograma na 21. konferencji CGPM w roku 1999, podejmując Rezolucję 7 rekomendującą wykorzystanie obu wyżej wymienionych metod w pracach badawczych, których celem miało być wypracowanie nowej definicji i realizacji kilograma [35]; obie owe metody były traktowane jako równoprawne i konkurencyjne. Kilka innych sposobów redefinicji kilograma również brano wówczas pod uwagę, ale nie spełniły one oczekiwań [25, 36–41].

Jak wspomniano w rozdziale 1, na przełomie 2004 i 2005 r. proponenci redefinicji kilograma opublikowali artykuł [9] podsumowujący stan badań w tej dziedzinie, postulując przeprowadzenie redefinicji kilograma już na 23. konferencji CGPM w 2007 r. Znaczne rozbieżności wyników uzyskanych w projekcie wagi Watta i w projekcie Avogadro, o których piszę obszerniej w rozdziale 6, były jedną z przyczyn, dla których dotrzymanie tego niezwykle ambitnego (żeby nie powiedzieć przedwczesnego) terminu nie było możliwe.

Prace badawcze nad redefinicją kilograma oraz tocząca się równolegle ożywiona dyskusja doprowadziły do przekonania o konieczności przeprowadzenia redefinicji również innych niż kilogram jednostek podstawowych układu SI. Przekonanie to znalazło wyraz w rekomendacjach podjętych przez 5 komitetów doradczych CIPM (CCM, CCEM, CCQM, CCT i CCU²), które podsumowano w Rekomendacji 1 przyjętej przez CIPM w październiku 2005 r. [11]; w ten sposób, prace nad pomiarem stałej Avogadro z wykorzystaniem kryształu krzemu zaczęły spełniać podwójną rolę: jako przygotowanie do redefinicji kilograma i do ewentualnej redefinicji mola.

Projekt Avogadro (IAC) rozpoczął się oficjalnie w 2004 r., gdy BIPM zorganizował konsorcjum 7. Krajowych Instytutów Metrologicznych (ang. *National Metrology Institutes*, NMI), by wspólnymi siłami zmierzyć się z problemem pomiaru stałej Avogadro za pomocą artefaktów w postaci 2. kul krzemowych. Do konsorcjum wszedł PTB (Niemcy), NMIA (Australia), NMIJ (Japonia), NIST (USA), NPL (Zjednoczone Królestwo), INRIM (Włochy) i IRRM (unijny instytut badawczy usytuowany w Belgii), a istotną część prac, polegającą na wzbogaceniu krzemu naturalnego w izotop ²⁸Si, wykonano w Rosji. Koordynatorem tego przedsięwzięcia był i pozostaje nim nadal Alain Picard, dyrektor Wydziału Masy BIPM, pomimo iż projekt IAC jest obecnie związany głównie z redefinicją mola, a nie kilograma; na marginesie dodam, że w projekcie wagi Watta i redefinicji kilograma pierwsze skrzypce grają elektrycy, zgodnie z zasadą, iż w sprawnie funkcjonujących organizmach kompetencje merytoryczne przeważają nad względami administracyjnymi (waga Watta wywodzi się z wyrafinowanej formy wagi prądowej). Projekt IAC zakończył się formalnie w 2011 r., ale już podpisano porozumienie, by badania te kontynuować jeszcze przez 6 lat [42].

4. ZASADA POMIARU W PROJEKCIE AVOGADRO I SPOSÓB REDEFINICJI MOLA

W obowiązującym obecnie układzie jednostek miar SI [5], jednostka liczności materii (mol) jest zdefiniowana poprzez odniesienie do liczby atomów znajdujących się w 12 gramach izotopu ¹²C. Definicja ta operuje masą jako pojęciem pierwotnym, natomiast liczba atomów w 1 molu, czyli liczba Avogadro, jest wielkością wtórną, podlegającą pomiarowi. Wynika stąd, iż (1) wartość N_A jest obarczona niepewnością pomiaru, oraz (2) niemożliwe jest ustalenie dokładnej wartości liczbowej N_A na mocy definicji, ponieważ byłoby to sprzeczne z obecną definicją mola i kilograma.

Definityjny związek mola i stałej Avogadro z jednostką masy zaowocował pomysłem, by kilogram związać nie ze stałą Plancka h (tak jak to jest w projekcie

2 CCM = *Consultative Committee for Mass and Related Quantities* (Komitet Doradczy ds. Masy i Wielkości Związanych); CCEM = *Consultative Committee for Electricity and Magnetism* (Komitet Doradczy ds. Elektryczności i Magnetyzmu); CCQM = *Consultative Committee for Amount of Substance* (Komitet Doradczy ds. Liczności Materii); CCT = *Consultative Committee for Thermometry* (Komitet Doradczy ds. Termometrii); CCU = *Consultative Committee for Units* (Komitet Doradczy ds. Jednostek Miar).

wagi Watta), ale właśnie z N_A . Można mianowicie ustalić wartość stałej Avogadro (lub liczby³ Avogadro), a kilogram zdefiniować jako masę pewnej ustalonej liczby moli (lub liczby atomów) danego rodzaju. Projekt IAC, zwany też „projektem kuli krzemowej”, przyjął początkowo taką właśnie strategię. Dużą zaletą takiej redefinicji jednostki masy byłaby (pozorna⁴) prostota pojęciowa i wynikająca stąd intuicyjność tak sformułowanej definicji kilograma; natomiast poważną wadą takiego podejścia byłoby utrzymanie zależności między dwiema jednostkami podstawowymi SI (jednostką masy i jednostką liczności materii) na poziomie definicji, co nie jest uzasadnione względami fizycznymi.

Projekt IAC przewidywał, że kilogram będzie zdefiniowany jako masa ($10^3 \times N_A \times \text{mol}/12$) atomów węgla ^{12}C (w domyśle: swobodnych, w spoczynku i niewzburzonych), oraz że jednostka masy będzie zrealizowana w postaci idealnego monokryształu (bez domieszek i defektów). Miło byłoby umieć wyhodować nieskazitelny kilogramowy monokryształ czystego izotopowo diamentu, celem realizacji tak zdefiniowanej jednostki masy oraz rozwiązania problemu podarunków świątecznych, ale nie zawsze „chcieć to móc”; ze względu na doskonale opanowaną technologię otrzymywania czystych monokryształów krzemu metodą Czochralskiego oraz wysoką stabilność struktury krystalicznej tego pierwiastka, do realizacji kilograma i pomiaru N_A wybrano właśnie krzem. Masa m monokryształu Si jest wprost proporcjonalna do liczby zawartych w nim atomów ($n V / V_0$) oraz masy jednego atomu (M / N_A) i dana jest wyrażeniem

$$m = \frac{n V}{V_0} \cdot \frac{M}{N_A}, \quad (1)$$

gdzie N_A oznacza stałą Avogadro, M – masę molową krzemu, V – objętość kryształu, V_0 – objętość komórki elementarnej sieci krystalicznej krzemu, zaś n – liczbę atomów w komórce elementarnej kryształu Si ($n = 8$ dla struktury typu diamentu, czyli sieci regularnej powierzchniowo centrowanej, w jakiej krystalizuje krzem).

3 Rozróżnianie między stałą Avogadro N_A (wielkość mająca wartość liczbową i wymiar fizyczny mol^{-1}), a liczbą Avogadro $\{N_A\}$ (wartość liczbową, bezwymiarową) można uważać za dzielenie włosa na czworo, ale metrologicy nie takie rzeczy potrafią robić, i to bez znieczulenia. W tej pracy N_A symbolizuje zarówno stałą Avogadro, jak i liczbę Avogadro. Zwyczajowo utożsamiamy oba te pojęcia lub używamy tylko terminu „stała”, rezerwując słowo „liczba” dla liczby Loschmidta. W CODATA i literaturze angielskojęzycznej najczęściej używa się nazw „Avogadro constant” i „Loschmidt constant”, bez względu na okoliczności. Gdy purysta terminologiczny chce podkreślić, że chodzi o wartość liczbową wielkości Y , to stosuje nawias klamrowy $\{Y\}$, a wymiar fizyczny tej wielkości oznacza nawiasem kwadratowym $[Y]$, tzn. $N_A \equiv \{N_A\} [N_A]$.

4 Masa jest pojęciem prostym tylko na poziomie codziennego doświadczenia. Zostawiając fizykom wnikanie w istotę masy jako skutku istnienia pola Higgsa, chemicy wiedzą doskonale, że ze względu na energię wiązania, masa atomów Si w sieci krystalicznej jest mniejsza o $1,4 \times 10^{-8}\%$ od masy atomów swobodnych, z których kryształ został utworzony, co musi być uwzględnione w definicji i w pomiarach na najwyższym poziomie metrologicznym (pomiaru masy atomowej wykonuje się zarówno dla stanu związanego, jak i dla atomów oraz jonów swobodnych). Istotna jest również temperatura i stopień wzbudzenia atomów, bowiem energia ruchów termicznych w temperaturze pokojowej stanowi $\sim 10^{-10}\%$, a energia wzbudzenia atomu może przekroczyć $10^{-6}\%$ jego energii spoczynkowej (masy spoczynkowej).

Dysponując dokładnie zmierzonymi wartościami parametrów kryształu krzemu (M , V i V_0), równanie (1) można interpretować na dwa sposoby:

- I. Jeżeli zważymy kulę krzemową (zmierzymy m) stosując obecny definicyjny wzorzec kilograma (IPK lub, w praktyce, jego „oficjalne kopie”), to możemy obliczyć wartość stałej Avogadro N_A wraz z towarzyszącą temu pomiarowi niepewnością;
- II. Jeżeli natomiast kilogram zdefiniujemy jako masę dokładnie określonej liczby atomów danego rodzaju oraz ustalimy wartość N_A na mocy teźże definicji, to pomiar parametrów M , V i V_0 kryształu krzemu określi jego masę m wraz z towarzyszącą temu pomiarowi niepewnością, bez konieczności faktycznego *ważenia* tego ciała, a monokryształ Si stanie się pierwotną realizacją jednostki masy.

Nie można oczywiście przyjąć obu koncepcji jednocześnie, ponieważ nie można zdefiniować tej samej wielkości (kilograma) na dwa różne sposoby naraz, bo popadlibyśmy w sprzeczność. Pierwotny zamysł projektu IAC polegał na tym, by korzystając z pierwszej koncepcji (tzn. posługując się równaniem (1) i obecną definicją kilograma) zmierzyć jak najdokładniej wartość N_A dla kuli krzemowej, a następnie odrzucić koncepcję pierwszą i przyjąć tę drugą, w której: (a) na mocy definicji ustalona byłaby *dokładna* wartość N_A ; (b) kilogram zdefiniowany byłby jako masa ściśle określonej liczby atomów ^{12}C ; zaś (c) pierwotną realizacją kilograma byłby, ze względów praktycznych, monokryształ Si.

Gdy wraz z postępem prac nad redefinicjami jednostek SI stało się jasne, że redefinicja kilograma będzie polegać na ustaleniu wartości stałej Plancka, a jednostka masy będzie odtwarzana za pomocą wagi Watta, to przeinterpretowano projekt IAC tak, aby jego wyniki wykorzystać do zredefiniowania mola (zamiast kilograma). Obecnie przyjmuje się, że (a) wartość stałej Avogadro N_A (zmierzona z dużą dokładnością w programie IAC z wykorzystaniem IPK) będzie ustalona na mocy definicji; (b) mol, na mocy tej samej definicji, będzie zredefiniowany jako liczba Avogadro cząstek danego rodzaju; natomiast (c) monokryształ Si będzie interpretowany jako pierwotna realizacja jednostki liczności materii (a nie kilograma).

W sierpniu 2010 r. w CCU powstał projekt redefinicji jednostek podstawowych układu SI [43]; proponowana definicja mola brzmi: „*The mole, mol, is the unit of amount of substance of a specified elementary entity, which may be an atom, molecule, ion, electron, any other particle or a specified group of such particles; its magnitude is set by fixing the numerical value of the Avogadro constant to be equal to exactly $6.022\ 14X \times 10^{23}$ when it is expressed in the unit mol^{-1} .*”, czyli „Mol, [oznaczany symbolem] mol, jest jednostką liczności materii składającej się z określonej liczby takich samych cząstek, którymi mogą być atomy, cząsteczki, jony, elektrony, jakiegokolwiek inne cząstki lub określone grupy takich cząstek; wartość [tej jednostki] jest określona poprzez ustalenie wartości liczbowej stałej Avogadro, która wynosi dokładnie $6,022\ 14X \times 10^{23}$ w jednostkach mol^{-1} ”. Symbol X oznacza ewentualne dalsze cyfry dziesiętne, które mają być ustalone tak, aby była jak najmniejsza różnica między dotychczas stoso-

waną wartością mola, a wartością tej jednostki wynikającą z nowej definicji; chodzi o to, by zminimalizować wpływ zmiany definicji mola na praktykę laboratoryjną.

5. TECHNICZNY ASPEKT REALIZACJI PROJEKTU AVOGADRO

Wzór (1) na masę monokryształu zawiera masę molową M . Pomiar tego parametru z niepewnością względną lepszą niż 10^{-8} jest trudny nawet dla pierwiastków chemicznych zawierających tylko jeden izotop. Gdy pierwiastek składa się z kilku trwałych izotopów, to określenie M z taką niepewnością wymaga pomiaru względnej zawartości izotopów (abundancji) i ich mas atomowych z dokładnością $\sim 10^{-9}$, a w dodatku próbka musiałaby być jednorodna izotopowo na poziomie $10^{-9} \div 10^{-10}$. W przypadku krzemu naturalnego okazało się to niemożliwe.

Krzem naturalny ma złożony skład izotopowy; oprócz trwałych izotopów krzemu (92,2297% ^{28}Si ; 4,6832% ^{29}Si ; 3,0871% ^{30}Si) występują śladowe ilości promieniotwórczego ^{32}Si , a mogą pojawiać się także zaniedbywalne na ogół ślady krótkożyłowego ^{31}Si (oba izotopy podlegają rozpadowi β^-). W pierwszym, wstępnym etapie realizacji projektu Avogadro, krzem naturalny poddano wzbogaceniu w izotop ^{28}Si . Około 20 kg fluorku krzemu (naturalnego) SiF_4 wzbogacono do poziomu 99,995% izotopu ^{28}Si za pomocą ultrawirówek. Wzbogacony gazowy SiF_4 poddano reakcji podstawienia fluoru wodorem otrzymując SiH_4 . W wyniku termicznego rozkładu wodorku krzemu (chemiczne osadzanie z fazy gazowej) otrzymano czysty krzem w postaci polikrystalicznej i wodór. Ten wstępny, ale niezwykle ważny etap wzbogacenia i krystalizacji krzemu wykonano w Rosji, otrzymując ponad 5-kilogramowy polikryształ Si, który przekazano do Niemiec.

W Niemczech, polikryształ ^{28}Si poddano rekrytalizacji metodą Czochralskiego, uzyskując ok. 5-kilogramowy monokryształ ^{28}Si w formie zbliżonej do walca o średnicy ok. 10 cm, z dwoma wybrzuszeniami, a zakończony stożkiem. Monokrystaliczna postać krzemu ułatwia pomiar stałych sieciowych, zapewnia jednorodność i stałą gęstość materiału oraz minimalizuje poziom zanieczyszczeń (domieszek) i innych defektów sieci oraz tworzenie się powierzchni granicznych i naprężeń charakterystycznych dla struktury polikryształu. Monokryształ ^{28}Si przekazano do Australii.

Z owych dwu wybrzuszeń monokryształu ^{28}Si wypreparowano 2 kule o średnicy ok. 10 cm i masie ponad 1 kg każda oraz kilka mniejszych kul i wiele próbek z różnych miejsc monokryształu do badań materiałowych. Dwie większe kule oszlifowano do średnicy ok. 9,35 cm i wypolerowano tak perfekcyjnie, że odstępstwa od idealnie sferycznego kształtu mieszczą się w granicach 60 nm, a różnice między największymi i najmniejszymi średnicami (zmierzono ich kilkaset) mieszczą się w granicach 100 nm. Kształt kulisty monokryształów krzemu (w przeciwieństwie do IPK, który ma formę walca) wybrano ze względu na łatwiejsze wykonanie tak doskonałego szlif w przypadku ciał o symetrii sferycznej, oraz dlatego, że sferyczny kształt obiektu ułatwia bardzo dokładny pomiar jego objętości (brak krawędzi i tylko jeden parametr do pomiaru – średnica).

Kule ^{28}Si poddano wszechstronnym badaniom; większość badań materiałowych można było wykonać posługując się kulami pomocniczymi, zmniejszając tym samym ekspozycję dwu kul wzorcowych na czynniki zewnętrzne. Zauważmy na przykład, że wzór (1) można przekształcić do postaci $N_A = (n M) / (V_0 \rho)$, gdzie zamiast masy i objętości danego monokryształu wzorcowego występuje jego gęstość $\rho = m/V$, która jest taka sama dla kul wzorcowych i kul pomocniczych; pomiar gęstości wymaga wielokrotnego ważenia kul w powietrzu, w próżni, a nawet w płynie [44], co nie pozostaje bez wpływu na ich powierzchnię. Ponadto, użycie kilku kul pomocniczych pozwoliło wykonywać pomiary jednocześnie w różnych instytutach badawczych i różnymi metodami, co skróciło czas badań, umożliwiło weryfikację wyników, minimalizację niepewności pomiarów oraz pozwoliło wnioskować o jednorodności materiału pod względem obecności domieszek i innych niedoskonałości sieci [45].

Pomiary objętości wykonano mierząc średnicę kul metodą interferometrii optycznej z dokładnością 0,6 nm, co odpowiada grubości rzędu 2 warstewek atomowych [46–49]. Kule ważono z wykorzystaniem najwyższej klasy wzorców dostępnych w BIPM; pomiary masy wykonano w próżni, ale także w powietrzu – uwzględniając poprawki zależne od ciśnienia, temperatury i wilgotności [50–54]. Masę molową krzemu zmierzono metodą spektrometrii masowej, stosując technikę rozcieńczenia izotopowego (IDMS), a za wzorcowe materiały odniesienia posłużyły próbki naturalnego krzemu wzbogaconego w znaną ilość izotopów ^{28}Si , ^{29}Si , ^{30}Si [55, 56]. Pomiary stałej sieciowej a krzemu (z której obliczana jest objętość komórki elementarnej, $V_0 = a^3$) wykonano metodą interferometrii rentgenowskiej skombinowanej z interferometrią w zakresie optycznym [57, 58].

W pomiarach masy, objętości, gęstości, masy molowej i objętości komórki elementarnej uwzględniono obecność domieszek w monokryształach (głównie tlenu, boru i węgla) i innych niedoskonałości sieci oraz występowanie warstewek powierzchniowych na kulach krzemowych (są to tlenki krzemu SiO i SiO_2 , woda związana chemicznie i zaadsorbowana fizycznie, a także warstewki krzemków Cu, Ni, Zn i warstewki węglowodorów). Warstewki te były szczegółowo przebadane i wzięto pod uwagę zarówno ich grubość (w sumie poniżej 3 nm), jak i zróżnicowanie właściwości fizycznych [59–60]. Jest to ważny aspekt analizy wyników pomiarów, ponieważ np. niedokładność pomiaru średnicy rzędu 1 nm (10 Å) dałaby wkład do całkowitej niepewności względnej $u_r \sim 1,5 \times 10^{-8}$, przy docelowej wartości złożonej względnej niepewności standardowej $u_r \leq 2 \times 10^{-8}$, a przecież jest to tylko jedno z licznych źródeł niepewności pomiaru w projekcie IAC [61]. Daje to wyobrażenie o skali trudności całego tego przedsięwzięcia i o perspektywach projektu IAC w kontekście poszukiwania trwałego rozwiązania problemu definicji i realizacji jednostek SI (kilograma i mola).

6. KWESTIA ROZBIEŻNOŚCI WYNIKÓW PROJEKTU AVOGADRO I PROJEKTU WAGI WATTA

W początkowej fazie badań, projekt Avogadro (IAC) miał charakter konkurencyjny w stosunku do koncepcji wagi Watta. Obie metody redefinicji kilograma można porównać dzięki związkowi stałej Avogadro ze stałą Plancka [9, 12, 23, 26]

$$N_A = \frac{c \alpha^2 A_{el} M_u}{2 R_\infty} \cdot \frac{1}{h}, \quad (2)$$

gdzie c oznacza szybkość światła w próżni, α – stałą struktury subtelnej, A_{el} – względną masę atomową elektronu (tzn. wyrażoną w jednostkach masy atomowej), M_u – stałą molarną ($M_u = 10^{-3}$ kg/mol), a R_∞ – stałą Rydberga. Wszystkie składowe współczynnika proporcjonalności w relacji (2) są znane z bardzo dużą dokładnością (CODATA podaje względną niepewność standardową tych wielkości: $u_r(\alpha) = 3,3 \times 10^{-10}$; $u_r(A_{el}) = 4,0 \times 10^{-10}$; $u_r(R_\infty) = 5,0 \cdot 10^{-12}$), co pozwala porównać stałą Avogadro N_A , uzyskaną w projekcie IAC, ze stałą Plancka h , określoną w projekcie wagi Watta (NIST).

Już pierwsze porównania wyników otrzymanych w projekcie Avogadro i w projekcie wagi Watta wykazały ich niespójność [62, 63]. Zaobserwowana rozbieżność wartości h uzyskanej w obu projektach wynosiła $\Delta h_{A-W} / h \sim 10^{-6}$, czyli była o 2 rzędy wielkości większa niż docelowa niepewność względna obu pomiarów ($u_r \leq 2 \times 10^{-8}$). Przede wszystkim zaś (1) różnica ta była znacznie większa niż można to usprawiedliwić niepewnością pomiarów; oraz (2) nie była znana fizyczna przyczyna tak zasadniczej różnicy między oczekiwaniami a rzeczywistością. Rozbieżność między wynikami uzyskanymi tymi dwiema metodami była główną przyczyną merytoryczną zawieszenia przygotowań do przeprowadzenia redefinicji kilograma, ampera, kelwina i mola, którą niektórzy metrologicy z BIPM, NIST i CCU planowali przeforsować już na 23. konferencji CGPM w 2007 r.

W październiku 2008 r. stwierdzono, że przyczyną owej rozbieżności była niewystarczająca dokładność oznaczenia składu izotopowego krzemu, co implicite wpłynęło na masę molową krzemu, M . Po wprowadzeniu odpowiednich poprawek w grudniu 2008 r., niezgodność N_A z h zmalała do wartości mieszczącej się w granicach uzasadnionych niepewnością obu pomiarów. Aby zweryfikować tę przyczynę błędu i dalej zmniejszyć niepewność pomiaru M , analizę składu izotopowego przeprowadzono jeszcze kilkakrotnie, w kilku laboratoriach i różnymi metodami. Najskuteczniejsza okazała się metoda rozcieńczenia izotopowego (IDMS); praktyka pokazała, że nawet śladowe zanieczyszczenia odczynników użytych do przygotowania próbek do badań metodą gazowej spektrometrii masowej (GMS) mogą w zasadniczy sposób zaważyć na wynikach końcowych [61, 64].

7. OBECNY STAN PROJEKTU AVOGADRO I PERSPEKTYWA FINALIZACJI REDEFINICJI MOLA

Projekt Avogadro (ang. *International Avogadro Coordination*, IAC) formalnie zakończył się w kwietniu 2011 r. Zmierzona wartość stałej Avogadro wynosi $N_A = 6,022\,140\,82 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$, bezwzględna niepewność standardowa wynosi $u(N_A) = 1,8 \times 10^{16} \text{ mol}^{-1}$, a niepewność względna $u_r(N_A) = 3,0 \times 10^{-8}$ przekroczyła nieco założoną wartość docelową $u_r(N_A) \leq 2,0 \times 10^{-8}$ [61, 65].

Przekroczenie docelowej wartości $u_r(N_A)$ przypisywane jest obecności cienkiej warstewki krzemków metali na powierzchni obu kul wzorcowych, która powstała w trakcie ich szlifowania i wpływa na pomiar kilku parametrów, a przede wszystkim objętości. Największy (66%) wkład do $u_r(N_A)$ daje właśnie pomiar objętości (średnicy) kul wzorcowych, a na drugim miejscu (18%) plasuje się wkład związany bezpośrednio z własnościami warstewek powierzchniowych. Pomiar masy molowej, który sprawił tyle kłopotów kilka lat wcześniej, daje obecnie tylko 5% wkład do $u(N_A)$; pomiar objętości komórki elementarnej (stałej sieciowej) – 9%; pomiar masy – 1%; zaś wpływ defektów wewnętrznych monokryształu oceniany jest na 1% wkładu do $u(N_A)$. Cytowane tu wartości odnoszą się do pomiarów wykonanych dla jednej z kul wzorcowych (AVO28-S5), dla której całkowita niepewność względna wynosi $u_r(N_A) = 3,6 \times 10^{-8}$; ponieważ pomiary dla drugiej kuli wzorcowej (AVO28-S8) dały bardzo podobne wyniki, to podana powyżej niepewność względna $u_r(N_A) = 3,0 \times 10^{-8}$ dla całego projektu jest nieco mniejsza, niż dla każdej z kul osobno [61, 65]. Dla porównania przypomnijmy, że w 2010 r. niepewność względna w projekcie IAC wynosiła $u_r(N_A) = 3,1 \times 10^{-7}$, a w projekcie wagi Watta (NIST) wynosiła $u_r(h) = 3,6 \times 10^{-8}$.

Pomimo znacznego postępu, jaki dokonał się w ciągu ostatnich dwu lat, projekt Avogadro nie stanowi już konkurencji dla redefinicji jednostki masy poprzez ustalenie wartości stałej Plancka oraz realizacji kilograma za pomocą wagi Watta. Pomiar stałej Avogadro w projekcie IAC posłużył do przeprowadzenia redefinicji jednostki liczności materii (mola) poprzez ustalenie wartości N_A , a owe dwie kule krzemowe, w których liczba atomów została bardzo dokładnie określona, będą stanowić pierwotną realizację mola. Możliwość porównania wyników uzyskanych w tych dwu niezależnych projektach (patrz równanie (2)), pozwala zweryfikować poprawność ich koncepcji i wykonania, co zalecała Rezolucja 7., podjęta przez CGPM w 1999 r. [35].

Projekt Avogadro, interpretowany jako przygotowanie do redefinicji mola, ma też parę słabości: (1) wytworzenie kilogramowych, czystych izotopowo monokryształów krzemu było możliwe dzięki perfekcyjnej technologii opracowanej na potrzeby przemysłu elektronicznego, a takich technologii nie ma w przypadku innych substancji; (2) procedura liczenia atomów w monokryształach krzemu jest unikatowa, co implikuje trudność przeniesienia jednostki (mola) z wzorca pierwotnego na wzorce niższego rzędu i inne substancje chemiczne; (3) problem zmian na powierzchni wzorcowych kul krzemowych wcale nie jest mniejszy niż w przypadku artefaktów platynowo-irydowych. Wydaje się zatem, że po wykorzystaniu kul krzemowych

do pomiaru N_A , po przeprowadzeniu redefinicji mola i zademonstrowaniu sposobu realizacji tej jednostki, najwłaściwszym miejscem dla kul krzemowych będzie muzeum. Natomiast waga Watta jest urządzeniem uniwersalnym, które może być używane wielokrotnie i służyć do pomiaru masy wielu różnych ciał.

Zakończenie projektu Avogadro (IAC) w 2011 r. należy rozumieć nie jako definitywne jego zamknięcie, ale jako zakończenie pewnego etapu organizacyjno-financego. Podpisano już Memorandum, które przewiduje kontynuowanie tego projektu pod nazwą *International Avogadro Project* (IAP) przez następnych 6 lat, czyli do 2017 r. Termin ten jest dość odległy, zwłaszcza, że cel (pomiar N_A z niepewnością względną $u_r(N_A) \leq 2,0 \times 10^{-8}$) został już prawie osiągnięty, a metody pomiaru są opracowane; przede wszystkim zaś zauważmy, że projekt IAP zakończy się dopiero w parę lat po planowanej na 2014 r. lub 2015 r. następnej, 25. konferencji CGPM, na której reforma układu SI ma szansę już być sfinalizowana.

PODSUMOWANIE I Dyskusja

Projekt Avogadro jest ważnym elementem przygotowań do reformy międzynarodowego układu jednostek miar SI. Reforma ta będzie polegać na: (1) redefinicji czterech jednostek podstawowych SI (kilograma, ampera, kelwina i mola) poprzez ustalenie wartości liczbowych przypisanych im stałych fizycznych (h – stała Plancka, A – ładunek elementarny e , K – stała Boltzmanna k_B i mol – stała Avogadro N_A); (2) opracowaniu *mise en pratique* tych jednostek; oraz (3) preredagowaniu definicji i wprowadzeniu poprawek do zalecanych sposobów realizacji pozostałych jednostek podstawowych SI. Ze względu na znaczny zakres zmian i szerokie wykorzystanie wzorców kwantowych do realizacji jednostek miar, zreformowany SI nazywany jest Nowym SI lub Kwantowym SI (ang. *New SI* lub *Quantum SI*), a ze względu na eliminację ostatniego artefaktu definicyjnego (IPK) można go nazwać *Artefact-Free SI* (AF-SI). Oficjalne stanowisko w sprawie sposobu i warunków przeprowadzenia reformy układu SI zostało ostatnio sformułowane w Rezolucji 1, podjętej na 24. konferencji CGPM w październiku 2011 r. [66].

Wprowadzenie nowych definicji jednostek podstawowych SI będzie niezwykle korzystne z punktu widzenia badań podstawowych oraz rozwoju tych rodzajów przemysłu, które wykorzystują najbardziej zaawansowane technologie. W Nowym SI wiele stałych fizycznych o podstawowym znaczeniu (h , e , k_B , N_A , stała Josephsona K_J , stała von Klitzinga R_K , stała Faradaya F , stała Stefana-Boltzmanna σ , stała gazowa R i wiele innych) uzyska dokładnie znaną, stałą wartość, zamiast wartości umownej lub zmierzonej z określoną niepewnością.

Niektóre obowiązujące obecnie definicje jednostek podstawowych SI nie są oparte na wielkościach absolutnych i pojęciach podstawowych⁵, a dotyczy to nie tylko kilograma. Na przykład, aktualna elektromagnetyczna definicja ampera zakłada, że równania Maxwella dokładnie opisują rzeczywistość fizyczną, a przecież od 1948 r. wiadomo, że jest to tylko klasyczne przybliżenie elektrodynamiki kwantowej (QED); definicja ampera jest niespójna z praktyką laboratoryjną, w której pomiary na najwyższym poziomie metrologicznym są realizowane z wykorzystaniem kwantowego efektu Halla i efektu Josephsona.

Definicje jednostek miar są tym trwalsze, w im większym stopniu abstrahują od konkretnych ciał materialnych i ich właściwości fizykochemicznych (zależnych od warunków zewnętrznych) oraz praw fizycznych, które odzwierciedlają obecny (tzn. chwilowy) stan wiedzy. Ideałem byłoby zdefiniować *wszystkie* jednostki podstawowe SI poprzez ustalenie wartości fundamentalnych stałych fizycznych; wówczas postęp naukowy i techniczny znajdowałby odzwierciedlenie jedynie w ewolucji zalecanych metod realizacji jednostek SI (*mise en pratique*) i nie wpływałby na wartość definicyjną tych jednostek. Jest to jednak kwestia dalszej przyszłości [67].

Program redefinicji jednostek SI będzie miał większy wpływ na funkcjonowanie laboratoriów fizycznych niż pracowni chemicznych, ze względu na inny poziom wymagań co do niepewności pomiarów w tych dwu dziedzinach. Ponadto, redefinicja mola nie ma tak uniwersalnego znaczenia jak redefinicja kilograma czy ampera i skupia uwagę przede wszystkim chemików i fizykochemików, ale jednoczesne przeprowadzenie *całego* programu redefinicji jest konieczne do zachowania spójności tego przedsięwzięcia.

Planowana reforma SI, polegająca na definicyjnym związaniu niektórych jednostek podstawowych SI ze stałymi fizycznymi, stanowi wielki krok w kierunku stworzenia trwałego, spójnego układu jednostek miar. Trzeba jednak przemyśleć jeszcze raz niektóre proponowane sformułowania nowych definicji. Projekt redefinicji jednostki liczności materii [43, 66] kopiuje niezręczność obecnej definicji mola, polegającą na podaniu spisu wybranych rodzajów cząstek, do których stosuje się pojęcie mola, z pominięciem innych rodzajów cząstek (np. wolnych rodników, fotonów). Kompletna lista różnych rodzajów cząstek nie istnieje i istnieć nie może, ponieważ byłaby ona zbyt długa, czasem niejednoznaczna i zawsze mogą pojawić się nowo odkryte cząstki (np. bozony Higgsa, aksjony, skyrmiony, cząstki supersymetryczne i ich konglomeraty) – czy wówczas będziemy zmieniać definicję mola? Ponadto, stwierdzenie czy cząstki są „takie same” zależy od subiektywnego punktu

5 Relatywistyka poważnie ograniczyła pojęcie absolutu w naukach ścisłych; w tej pracy, wielkość absolutna oznacza wielkość niezmienniczą względem dowolnej transformacji układu współrzędnych; stałe fizyczne i ich kombinacje są wielkościami absolutnymi; stałe materiałowe (makroskopowe i mikroskopowe) nie są wielkościami absolutnymi. Pojęcia podstawowe są to niedefiniowalne pojęcia elementarne (czas, odległość, masa, ładunek elektryczny, ładunek silny, ładunek słaby) oraz ich definicyjne kombinacje różniczkowe (prędkość, przyspieszenie, pęd, natężenie prądu, etc.). Należy odróżnić ideę pojęcia podstawowego, wprowadzonego na zasadzie definicji lub oznaczenia, od praw fizycznych, które podają związki między pojęciami podstawowymi i odzwierciedlają nasz aktualny stan wiedzy o prawach Natury.

widzenia i zastosowanego kryterium: czy np. enancjomery, molekuly o różnych konformacjach, cząsteczki o różnych konfiguracjach atomowych (np. monosacharydy w formie ketonowej i enolowej), jony o różnym stopniu solwatacji, cząstki o różnym stanie wzbudzenia elektronowego lub jądrowego są takimi samymi, czy różnymi cząstkami? Odpowiedź może być różna w zależności od rodzaju procesu, w którym te cząstki uczestniczą.

Definicja mola to nie jest właściwe miejsce do sporządzenia listy cząstek i kryteriów ich rozróżnialności. Nowa definicja mola powinna ograniczyć się do (1) określenia wartości stałej Avogadro (liczby Avogadro) N_A , oraz (2) stwierdzenia, że 1 mol zawiera dokładnie N_A cząstek danego rodzaju, pozostawiając użytkownikowi SI określenie kryteriów, według których cząstki są uważane za takie same lub różne [68]. Nie mogę oprzeć się refleksji, że taką właśnie prostą definicję mola poznałem od swej licealnej nauczycielki chemii, w wersji „*mol to liczba Avogadro cząstek danego rodzaju*” i służy mi ona świetnie do dziś. Może to posłużyć za ilustrację ogólnej zasady, sprawdzającej się nie tylko w nauce, iż droga poszukiwania prawdy może być długa i zawiła, ale samą prawdę charakteryzuje prostota.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] T. Quinn, J. Kovalevsky, Phil. Trans. R. Soc. A, 2005, **363**, 2307.
- [2] J. Kovalevsky, T.J. Quinn, Comptes Rendus Physique, 2004, **5**, 799.
- [3] Convention du Mètre, strona internetowa BIPM.
- [4] Metric Convention, strona internetowa US Metric Association.
- [5] BIPM, *The international System of Units (SI)*, 8th ed., 2006.
- [6] Rozporządzenie Rady Ministrów z 30 listopada 2006 r., Dziennik Ustaw Nr 225, poz. 1638 str. 11183.
- [7] G. Audi, A.H. Wapstra, C. Thibault, Nucl. Phys. A, 2003, **729**, 337.
- [8] J. Terrien, Metrologia, 1972, **8**, 32.
- [9] I.M. Mills, P.J. Mohr, T.J. Quinn, B.N. Taylor, E.R. Williams, Metrologia, 2005, **42**, 71.
- [10] R.S. Davis Phil. Trans. R. Soc. A, 2005, **363**, 2249.
- [11] CIPM-Recom1CI-2005-En.pdf, strona internetowa BIPM.
- [12] I.M. Mills, P.J. Mohr, T.J. Quinn, B.N. Taylor, E.R. Williams, Metrologia, 2006, **43**, 227.
- [13] J.C. Maxwell, *Address to the Mathematical and Physical Sections of the British Association, Liverpool, Sept. 15, 1870*; przedruk w *Maxwell on Molecules and Gases*, wyd. E. Garber, S.G. Brush, C.W.F. Everitt, Cambridge, MIT 1986, str. 89–104.
- [14] Resolution 6 of the 11th meeting of the CGPM (1960), strona internetowa BIPM.
- [15] Resolution 1 of the 13th meeting of the CGPM (1967/1968), strona internetowa BIPM.
- [16] T.H. Maiman, Nature, 1960, **187**, 493.
- [17] Resolution 1 of the 17th meeting of the CGPM (1983), strona internetowa BIPM.
- [18] B.P. Kibble, w *Atomic Masses and Fundamental Constants*, tom 5, J.H. Sanders, A.H. Wapstra (eds), New York, Plenum, 1976, str. 545–551.
- [19] B.P. Kibble, I.A. Robinson, Meas. Sci. Technol., 2003, **14**, 1243.
- [20] I.A. Robinson, B.P. Kibble, Metrologia, 2007, **44**, 427.
- [21] R. Steiner, D. Newell, E. Williams, J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol., 2005, **110**, 1.
- [22] A. Eichenberger, B. Jeckelmann, P. Richard, Metrologia, 2003, **40**, 356.

- [23] B.N. Taylor, P.J. Mohr, *Metrologia*, 1999, **36**, 63.
- [24] P. Becker, *Metrologia*, 2003, **40**, 366.
- [25] P. Becker, P. De Bièvre, K. Fujii, M. Glaeser, B. Inglis, H. Luebbig, G. Mana, *Metrologia* **44**, 2007, 1.
- [26] W. Schwitz, B. Jeckelmann, P. Richard, *Comptes Rendus Physique*, 2004, **5**, 881.
- [27] B.P. Leonard, *Metrologia* 2006, **43**, L3.
- [28] B.P. Leonard, *Metrologia* 2007, **44**, 82.
- [29] B.P. Leonard, *Metrologia* 2010, **47**, L5.
- [30] C. Egidi, *Nature*, 1963, **200**, 61.
- [31] U. Bonse, M. Hart, *Appl. Phys. Lett.*, 1965, **6**, 155.
- [32] R.D. Deslattes, A. Henins, H.A. Bowman, R.M. Schoonover, C.L. Carroll, I.L. Barnes, L.A. Machlan, L.J. Moore, W.R. Shields, *Phys. Rev. Lett.*, 1974, **33**, 463.
- [33] P. Becker, K. Dorenwendt, G. Ebeling, R. Lauer, W. Lucas, R. Probst, H.J. Rademacher, G. Reim, P. Seyfried, H. Siegert, *Phys. Rev. Lett.*, 1981, **46**, 1540.
- [34] G. Zosi, *Lett. Nuovo Cimento*, 1983, **38** 577.
- [35] Resolution 7 of the 21st meeting of the CGPM (1999), strona internetowa BIPM.
- [36] B.W. Petley, *Metrologia*, 2007, **44**, 69.
- [37] M. Gläser, *Metrologia*, 2003, **40**, 376.
- [38] J.W.G. Wignall, *Meas. Sci. Technol.*, 2005, **16**, 682.
- [39] J.W.G. Wignall, *Metrologia*, 2007, **44**, L19.
- [40] A. Razet, O. Houssin, J. Bastie, *Metrologia*, 2006, **43**, 367.
- [41] H. Kajastie, K.K. Nummila, A. Rautiainen, K. Riski, A. Satrapinski, *Metrologia*, 2008, **45**, 68.
- [42] International Avogadro Coordination (IAC) project, strona internetowa BIPM.
- [43] I. Mills, Draft Chapter 2 for SI Brochure, following redefinitions of the base units, CCU Report, 27th September 2010, strona internetowa BIPM.
- [44] K. Fuji, *Meas. Sci. Technol.*, 2006, **17**, 2551.
- [45] H. Fujimoto, A. Waseda, X. W. Zhang, *Metrologia*, 2011, **48**, S55.
- [46] R.A. Nicolaus, K. Fujii, *Meas. Sci. Technol.*, 2006, **17**, 2527.
- [47] N. Kuramoto, K. Fujii, K. Yamazawa, *Metrologia*, 2011, **48**, S83.
- [48] G. Bartl, H. Bettin, M. Krystek, T. Mai, A. Nicolaus, A. Peter, *Metrologia*, 2011, **48**, S96.
- [49] B. Andreas, L. Ferroglio, K. Fujii, N. Kuramoto, G. Mana, *Metrologia*, 2011, **48**, S104.
- [50] A. Picard, *Metrologia*, 2006, **43**, 46.
- [51] A. Picard, *Meas. Sci. Technol.*, 2006, **17**, 2540.
- [52] M. Borys, M. Gläser, M. Mecke, *Measurement*, 2007, **40**, 785.
- [53] A. Picard, N. Bignell, M. Borys, S. Downes, S. Mizushima, *Metrologia*, 2009, **46**, 1.
- [54] A. Picard, P. Barat, M. Borys, M. Firlus, S. Mizushima, *Metrologia*, 2011, **48**, S112.
- [55] A. Pramann, O. Rienitz, D. Schiel, J. Schlote, B. Güttler, S. Valkiers, *Metrologia*, 2011, **48**, S20.
- [56] S. Valkiers, G. Mana, K. Fujii, P. Becker, *Metrologia*, 2011, **48**, S26.
- [57] E. Massa, G. Mana, U. Kuetgens, L. Ferroglio, *Metrologia*, 2011, **48**, S37.
- [58] E. Massa, G. Mana, L. Ferroglio, E.G. Kessler, D. Schiel, S. Zakel, *Metrologia*, 2011, **48**, S44.
- [59] S. Zakel, S. Wundrack, H. Niemann, O. Rienitz, D. Schiel, *Metrologia*, 2011, **48**, S14.
- [60] I. Busch, Y. Azuma, H. Bettin, L. Cibik, P. Fuchs, K. Fujii, M. Krumrey, U. Kuetgens, N. Kuramoto, S. Mizushima, *Metrologia*, 2011, **48**, S62.
- [61] B. Andreas, Y. Azuma, G. Bartl, P. Becker, H. Bettin, M. Borys, I. Busch, P. Fuchs, K. Fujii, H. Fujimoto, E. Kessler, M. Krumrey, U. Kuetgens, N. Kuramoto, G. Mana, E. Massa, S. Mizushima, A. Nicolaus, A. Picard, A. Pramann, O. Rienitz, D. Schiel, S. Valkiers, A. Waseda, S. Zakel, *Metrologia*, 2011, **48**, S1.
- [62] R.L. Steiner, E.R. Williams, D.B. Newell, R. Liu, *Metrologia*, 2005, **42**, 431.

- [63] M.J.T. Milton, J.M. Williams, S.J. Bennett, *Metrologia*, 2007, **44**, 356.
- [64] E. Bulska, M.N. Drozdov, G. Mana, A. Pramann, O. Rienitz, P. Sennikov, S. Valkiers, The isotopic composition of enriched Si: a data analysis, *Metrologia*, 2011, **48**, S32.
- [65] B. Andreas, Y. Azuma, G. Bartl, P. Becker, H. Bettin, M. Borys, I. Busch, M. Gray, P. Fuchs, K. Fujii, H. Fujimoto, E. Kessler, M. Krumrey, U. Kuetgens, N. Kuramoto, G. Mana, P. Manson, E. Massa, S. Mizushima, A. Nicolaus, A. Picard, A. Pramann, O. Rienitz, D. Schiel, S. Valkiers, A. Waseda, *Phys. Rev. Lett.*, 2011, **106**, 030801.
- [66] Resolution 1 of the 24th meeting of the CGPM (2011), strona internetowa BIPM.
- [67] W.T. Chyla, *Acta Phys. Pol. A*, 2011, **120**, 998.
- [68] W.T. Chyla, *Metrologia*, 2012, **49**, no. 3, L11.

Praca wpłynęła do Redakcji 10 stycznia 2012

FELIETON NAUKOWY



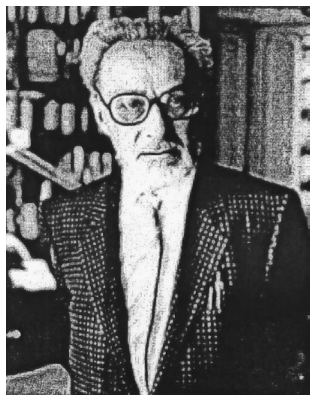
OKRUCHY XXVI.
O „UKŁADZIE OKRESOWYM” PRIMO LEVI’EGO

Ignacy Z. Siemion

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



Ignacy Z. Siemion, urodzony w 1932 r., ukończył studia chemiczne na Uniwersytecie Moskiewskim w 1955 r. Doktorat nauk technicznych na Politechnice Wrocławskiej – 1964. Doktor habilitowany nauk chemicznych – 1968. Profesor nadzwyczajny – 1974, profesor zwyczajny – 1981. Był kierownikiem Zakładu Chemii Organicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Własne zainteresowania badawcze: chemia i stereochemia peptydów i białek. Wypromował 23 doktorów chemii, z których pięcioro się habilitowało. Autor 9 książek, 275 prac oryginalnych i ponad 140 artykułów przeglądowych oraz dotyczących historii nauki. W latach 1983–1994 Redaktor Naczelny „Wiadomości Chemicznych”. Obecnie opiekun Gabinetu Historii Chemii Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego.



Fot. 1. Primo Levi

W 2011 roku ukazała się w krakowskim Wydawnictwie Literackim (z dość znacznym opóźnieniem) książka Primo Levięgo (1919–1987) pt. „Układ Okresowy”.

Autor, urodzony w Turynie, w zasymilowanej rodzinie żydów piemontckich, był z wykształcenia i wykonywanego przez szereg lat zawodu, chemikiem. Zawód ten jak sam pisze, uratował mu życie, gdy w lutym 1944 roku trafił do obozu w Auschwitz. Skierowano go do laboratorium chemicznego „Buna-Werke”, gdzie doczekał uwolnienia w styczniu 1945. Swoje obozowe doświadczenia zawarł w sławnej książce pt. „Czym jest człowiek?” (Kraków 1978).

Już wprowadzanie regulacji rasowych w latach trzydziestych, jakie miało miejsce w czasach Mussoliniego, uświadomiło mu, że jest jednak jakby obcy w rodzinnym od pokoleń kraju. Pobyt w obozie koncentracyjnym był jakby zakończeniem szkolenia w tym zakresie. Ale książka, o której tu mówimy, tylko marginalnie dotyka tego najważniejszego doświadczenia życiowego Levięgo. Raz je opisał i wyraźnie nie chciał już do niego wracać. O zamiarze, jaki mu przyświecał, kiedy tę książkę pisał, sam mówi tak: „Krążę w poszukiwaniu doświadczeń, swoich i cudzych, żeby opisać je w pewnej książce. Chciałem przekonać się, czy uda mi się przekazać laikom dojmujący i cierpki smak naszej sztuki, która jest przypadkiem szczególnym, bardziej waleczną wersją rzemiosła życia. (...) Wydaje mi się czymś niesprawiedliwym fakt, że świat wie wszystko na temat życia lekarza, prostytutki, marynarza, mordercy, hrabiny, starożytnego Rzymianina, spiskowca czy Polinezyjczyka, ale nic na temat tego, jak żyjemy my, pogromcy materii”. Krótko mówiąc, chciał się Levi przekonać, czy doświadczenia życiowe chemika mogą się stać materiałem literackim.

Jest to zamierzenie w literaturze pięknej, jak mi się wydaje, nowe. Zdarzają się wprawdzie literaci o wykształceniu chemicznym. W naszym kraju można tu wymienić choćby Leona Kruczkowskiego, czy Władysława Zembrzuskiego. Ale nikt się nie pokusił, by doświadczenia chemika uczynić tworzywem literackim.

Książka Levięgo to zbiór 23 opowiadań, noszących tytuły będące nazwami tyłuż pierwiastków chemicznych. Są to więc kolejno: argon, wodór, cynk, żelazo, potas, nikiel, ołów, rtęć, fosfor, złoto, cer, chrom, siarka, tytan, arsen, azot, cyna, uran, srebro, wanad i węgiel. Osia porządkująca te pierwiastki nie jest znany chemikom układ okresowy, lecz po prostu kolejność życia autora, na której to drodze spotkały go przygody z tymi pierwiastkami. Przy czym może to być spotkanie z samym pierwiastkiem, ale może też być przygoda z jakimś jego związkami, która staje się pretekstem do wymienienia nazwy odpowiedniego pierwiastka w tytule opowiadania. W ten sposób lista pierwiastków Levięgo to w gruncie rzeczy być może lista pierwiastków, z jakimi najczęściej spotyka się chemik w swojej działalności praktycznej? I taki właśnie jest figurujący w tytule książki „Układ Okresowy”.

Rozmieszczenie zaś „pierwiastków Levięgo” w „normalnym” układzie okresowym wygląda następująco:

1	H											C	N					
2																		
3													P	S	Ar			
4	K		Ti	V	Cr		Fe		Ni		Zn		As					
5													Ag		Sn			
6				Ce								Au	Hg	Pb				
7															U			

W tym wyborze, zwraca uwagę wysokie uprzywilejowanie pierwiastków czwartego okresu, stanowiące ponad trzecią część jego całości. To znaczy, że podstawową część pierwiastków, z którymi zetknął się Levi, stanowiły metale. To można łatwo zrozumieć. W obrębie zawodu chemicznego Levi reprezentował specjalizację analityczną. Co dawało mu zresztą pewną przewagę w jego drugiej życiowej pasji – w pisarstwie. Zadania analityczne to w największym stopniu zadania typu detektywistycznego. Chodzi tu przecież o rozwikłanie zagadki. Takie doświadczenie dość łatwo daje się przełożyć na język opowiadania literackiego.

Pierwszy rozdział książki – „Argon” – to rodzaj wprowadzenia do całości. Levi ma tu na uwadze szczególną cechę gazów szlachetnych – ich obcość, odmienność od pozostałych pierwiastków i chociaż w tytule stawia „argon”, to w tekście odwołuje się raczej do „ksenonu” – „obcego”. Nawiązuje, więc tutaj do swojego wyobcowania w rodzinnym od szeregu pokoleń kraju. Przodkowie, którzy niegdyś przybyli z Hiszpanii, do tego stopnia czuli się wrośnięci w tę ziemię, że dialekt piemoncki, co Levi ilustruje przykładami, przeniknął do hebrajskiego języka. Opowiada tutaj też o galerii postaci z legend rodzinnych, które zaznaczyły się swoją niezwykłością i barwnością. W ten sposób uzyskuje bolesny kontrast w stosunku do odrzucenia i wyobcowania, jakiego sam miał doświadczyć.

Następny rozdział „Wodór”, to historia intelektualnego i zawodowego kształtowania się przyszłego chemika i pisarza. A więc wczesne dziecinne jeszcze, doświadczenia z wybuchającym wodorem.

Levięgo „urzekło i onieśmieliło” szkło laboratoryjne a chemia objawiła się mu „jako nieokreślony obłok naciągających mocy „(...) Niczym Mojżesz z tego obłoku wypatrywałem, mego prawa, definicji, porządku we mnie, wokół mnie, i w świecie”. W uniwersyteckim laboratorium chemii ogólnej, pasywacja bardzo czystego cynku, słabo reagującego z kwasem siarkowym, nauczyła go doceniać rolę zanieczyszczeń w procesach chemicznych („Cynk”). Tam po raz pierwszy zetknął się z rzemiosłem chemicznym, z opanowaniem umiejętności wytworzenia czegoś własnymi rękoma. Jak świadczą wspomnienia Levięgo program nauczania stawiał na samodzielność wykonawców zadań, Laboratorium zaś zabierało pięć godzin dziennie. Levi odbywał studia chemiczne na początku lat czterdziestych. Studia, które sam odbywałem

(1950–1955) były niezbyt odległe w czasie oraz podobne, pod względem stawianych celów. Dużą rolę grało opanowanie rzemiosła chemicznego, to znaczy umiejętności pracy przy stole laboratoryjnym. Budowało to specjalny stosunek młodego chemika do przedmiotu studiów. Uczyło radości eksperymentowania. Taki właśnie stosunek do chemii przebija się z wywodów Levi’ego. Późniejsze lata zaczęły zacierać ten intymny kontakt studenta z materią zawodu. Kiedy w pewnym okresie przyszło mi prowadzić Komisję Dydaktyki Chemii, działającą w ramach Komitetu Nauk Chemicznych PAN, odruchowo działałem w stronę przywrócenia roli nauczania rzemiosła chemicznego, eksperymentu chemicznego w nauczaniu chemii. Dziś myślę, że było to działanie wsteczne. Cóż, w pracach nad dydaktyką zawsze ścierają się dwie tendencje: ludzi młodych, którzy wszystko by zmieniali, i starszych, którzy wszystko chcą zostawić niezmienione. Czytając książkę Levi’ego odnajdywałem więc podobne do własnych nastroje, poczucie radości z wykonanej własnymi rękoma pracy. Levi często nawiązuje do ówczesnej rzeczywistości politycznej Włoch. Pisząc więc o roli zanieczyszczeń powie: „Potrzebna jest niezgoda, odmienność, ziarno soli i gorczycy. Faszyzm ich nie chce, zakazuje, i dlatego nie jestem faszystą.”

Następne opowiadanie („Żelazo”) to wspomnienie o koledze, towarzyszu wędrówek i wspinaczek górskich, odważnemu oraz niezłomnemu, właśnie takiemu jak żelazo. To jedyne opowiadanie w całym tomie, gdzie cechy charakteru ludzkiego stają się odniesieniem do nazwy pierwiastka. Przyjaciel ten ginie na wojnie. Tymczasem w 1939 roku ogłoszono prawa rasowe, ograniczające między innymi możliwości pracy dla miejscowych Żydów. „Chemia i fizyka – odnotował Levi – którymi się żywił, poza tym, że z natury są życiodajną strawą, stanowią owo poszukiwane antidotum na faszyzm, ponieważ są jeszcze i wyraźne, i na każdym kroku sprawdzalne.”

Rok 1941 przyniósł powszechne przekonanie o nadchodzącym zwycięstwie Niemców. Okres ten upamiętnił Levi w opowiadaniu pt. „Potas”. Levi przekonał się wtedy, że chemia nie daje mu jednak odpowiedzi na dręczące pytania. Jej reguły zbyt blisko przypominają przepisy książki kucharskiej. „Należało – pisze Levi – pójść dalej, cofnąć się do źródeł, do matematyki i fizyki.” Idąc za tym odruchem, zgłosił się Levi na staż do Instytutu Fizyki. Jego tamtejszy opiekun zlecił mu przygotowanie super czystych rozpuszczalników. Miał w planie sprawdzenie możliwości zastosowania równania Onsagera dla stężonych roztworów. Praca ta sprawiła Levi’emu wielką przyjemność. „Destylacja – pisał – jest piękna. Przede wszystkim, dlatego, że jest to praca powolna, filozoficzna i cicha, która daje zajęcie, ale także czas na rozmyślanie o innych sprawach (...). A także i dlatego, że niesie w sobie przemianę: od cieczy do pary (niewidocznej) i z powrotem do cieczy (...). Kiedy przystępuje się do destylacji, ma się świadomość odtwarzania uświęconego przez wieki rytuału, aktu niemalże religijnego, w którym z niedoskonałej materii powstaje esencja, *ousia*, duch...” Odczucia, jakie ma Levi podczas tej operacji jakże są bliskie doznaniom dawnych alchemików, którzy swoje prace poczytywali za akt uzurpacji części potęgi boskiej, stwórczej. Tego rodzaju religijne rozumienie pracy chemika żywe jest jeszcze w psychice Levi’ego.

Prace destylacyjne przerwał wybuch resztek potasu metalicznego, pozostawionych na ściankach kolby. (Stąd tytuł rozdziału.) Opiekun – astrofizyk kładł Leviemu do głowy zwątpienie w moce fizyki. Uczył go, że fizyka zajmuje się „unormowaniem wszechświata pozorów”. Zamiast więc pewności, że znalazł się w świecie ostatecznych prawd wyniósł Levi ze stażu przekonanie o ich kruchości.

W lipcu 1941 roku Levi, po ukończeniu studiów chemicznych, trafia do pracy w kopalni azbestu, położonej w górach Piemontu. Kolonia pracownicza żyje tam w całkowitym odosobnieniu. W złożu azbestowym, przenikającym skałę serpentynitową, odkryto ślady niklu. Zadaniem Levięgo było określenie miejsc w złożu, gdzie stężenie niklu jest wyższe, co być może uczyniłoby je opłacalnym dla eksploatacji. (Rozdział „Nikiel”). „Analiza ilościowa – zanotował Lervi – tak uboga w emocje i ciężka jak granit, stawiała się żywa, prawdziwa, pożyteczna, stanowiła część poważnego i konkretnego działania, była przydatna, okazała się elementem jakiegoś planu, niczem kostka mozaiki.” Niestety, odkrycie bogatszych złóż rudy niklu w Albanii położyło kres tym poczynaniom.

Samotne życie w całkowitej izolacji, ubarwiane tylko małymi skandalami obyczajowymi wśród niewielkiej gromadki pracowników kopalni, pobudzało, jak się wydaje, autorską wenę Leviego. Napisał tam dwa opowiadania, które po latach włączył do „Układu okresowego”. Są to opowiadania „Ołów” i „Rtęć”. Pierwsze opisuje wędrowki poszukiwacza rud ołowiu w czasach starożytnego Rzymu. Drugie – przygody osadzonego na oceanicznej wyspie żołnierza. Z latami pojawia się na wyspie czwórka życiowych rozbitków. Wybuch tamtejszego wulkanu spowodował pojawienie się metalicznej rtęci w pobliskiej jaskini. Żołnierz uzyskuje czystą rtęć, za którą sprowadza dla wszystkich żony. W obu opowiadaniach łatwo można rozpoznać nastroje, jaki miewał Levi podczas swojego azbestowego odosobnienia. Sam przecież był tam poszukiwaczem rudy metalu, i zapewne cierpiał z racji pozbawienia go niewieściego towarzystwa.

W czerwcu 1942 roku Levi porzuca pracę w kopalni azbestu i znajduje zatrudnienie w Mediolanie, w laboratorium szwajcarskiego przedsiębiorstwa trudniącego się wytwarzaniem ekstraktów hormonalnych. Jego zadaniem jest sprawdzenie czy rzeczywiście, zgodnie z „teorią” nazistowskiego profesora Kerrna, wyciągi roślinne, zawierające organiczne związki fosforu (stąd nazwa rozdziału: „Fosfor”) mogą leczyć cukrzycę. „Nie jest to – pisze Levi – pierwiastek emocjonalnie neutralny. Było czymś niezrozumiałym, że jakiś profesor Kerrn, na wpół biochemik, na wpół czarnoksiężnik, w otoczeniu nazistowskiego dworu przesiąkniętego czarną magią, nadał mu rangę medykamentu.” Cała ta jednak przedsięwzięta dłubanina nie przyniosła żadnego pożytecznego efektu.

Tymczasem w losach wojny następuje przełom. We Włoszech następuje zapaść faszyzmu. Niemcy okupują północne Włochy. Levi, schwytany w górskim obozie włoskich partyzantów, uwięziony w piwnicy koszar wojskowych, słucha opowieści towarzysza niedoli, kontrabandyzisty, który latem zarabia na życie płukaniem złota w namulach rzeki Doro. Zawód ten uprawia rodzina przemytnika od pokoleń. „Nie wszystkie dni są odpowiednie – poucza Levięgo przemytnik – idzie lepiej, kiedy

dopisuje pogoda i jest ostatnia kwadra”. Dlaczego zaś właśnie ostatnia, to już tajemnica (Rozdział „Złoto”).

Stąd trafił Levi prosto do Auschwitz. Swoje wspomnienia oświęcimskie zawarł w innej książce; tu wraca do nich tylko sporadycznie. Dojmującym uczuciem, jakiego doznawał, było uczucie ciągłego głodu. Wśród odczynników laboratoryjnych szukał czegoś do zjedzenia. I trafił na słój z szarymi laskami stopu żelazowo-cerowego. Wraz ze współwięźniem wpadli na pomysł by laski te przerobić na kamienie do zapalniczek i zamienić je na żywność na obozowym czarnym rynku. To poczynanie pozwoliło mu przetrwać (Rozdział „Cer”).

Po wojnie podjął Levi pracę w fabryce lakierów. I tam zlecono mu zbadanie przyczyn zepsucia się partii farby chromianowej, która zgęstniała i nie nadawała się do użytku. Levi przedsięwziął intensywne studia w archiwum zakładu, gdzie przechowywano wszystkie wyniki badań analitycznych. Nie będę ich tu referował – pozostawiam to gorliwości czytelników. W każdym razie okazało się, że wytrząsanie zepsutej farby z salmiakiem regeneruje produkt. Odtąd zalecono dodawanie salmiaku do farby chromianowej i tak już trwało przez lata, i nikt już nie wiedział skąd się to wzięło. Levi rozważa ten przypadek, jako przykład powstawania i trwania w przemyśle tradycji niczym już potem nieuzasadnionych i zgoła nieprzydatnych. O których pochodzeniu nic się już nie wie. Ale przypadek ten jest jeszcze w innym aspekcie wysoce pouczający. Mówi nam o pożytku czerpania wiedzy z archiwów. Bez wątpienia od takich studiów trzeba zaczynać, kiedy przystępuje się do nowego zadania. Mój przyjaciel, Jurek Pabisz, dyrektor archiwum wojewódzkiego nieraz mi się zżymał na kompletne zapoznawanie ukrytej u niego wiedzy przez aktualnych demiurgów gospodarki. Organizował, więc specjalistyczne konferencje branżowe: a to o zasobach archiwum w zakresie gospodarki wodnej, a to leśnej. Bo takich umiejętności, korzystania z archiwum, nie dawały (i nie dają) studia specjalistyczne (Rozdział „Chron”).

Kolejne opowiadanie („Siarka”) opisuje pracę aparaturowego, któremu udaje się uniknąć grożącej awarii. Kolejne – to obrazek, gdzie dziecko podziwia malowanie mebli kuchennych białą tytanową. Może w tym właśnie opowiadaniu najmocniej odbija się ów podziw do tajemnic chemii, i czarnoksięskich nieomal mocy malarza, (czytaj: Chemika), tak namacalnie zmieniającego rzeczywistość.

Mimo tych sukcesów zawodowych, Levi porzuca fabrykę, by otworzyć, wraz z przyjacielem, prywatne laboratorium chemiczne. Tam ma różne doświadczenia. Oto niedaleki sąsiad, szewc, przynosi mu do analizy „cukier”, podrzucony mu przez konkurenta. „Cukier” okazuje się oczywiście arsenikiem („Arsen”). A to znowu pojawia się zapotrzebowanie na alloksan. Alloksan można by tanio uzyskać utleniając kwas moczowy, końcowy produkt przemiany azotowej u gadów i ptaków. Levi zdobywa więc pewną ilość pomiotu kurzego i przystępuje do pracy – ale nic z tego nie wychodzi. Najwidoczniej nie była to praca dla analityka. Zupełnie inny wynik miał kiedyś wrocławski organik, profesor Bobtański, który w swoim czasie opatentował sposób wydobycia kwasu moczowego z guana. Tyle, że spółdzielnia pracy, która próbowało patent wdrożyć też nie miała powodzenia. Bo widzi pan – mówił

mi kiedyś profesor – oni nie chcieli guana suszyć. I taką mokrą maź pakowali do kotła.

Nieopłacalna okazała się też chałupnicza produkcja chlorku cyny („Cyna”) przez rozpuszczenie cyny w kwasie solnym. Levi wraca do przemysłu. Zajmuje się teraz akwizycją zamówień w fabryce farb i lakierów. W swoich wędrówkach trafia na zawziętego rozmówcę, który obdarza go opowieścią o uciekających do Szwajcarii niemieckich lotnikach, którzy to za udzieloną im pomoc wynagrodzili go próbką metalicznego uranu. To skłania Levięgo do przywdziania ponownie fartucha analityka. Rzekomy uran okazał się metalicznym kadmem o nieznanym pochodzeniu (Rozdział „Uran”).

Inną opowieść przekazał mu dawny kolega ze studiów, pracujący w przemyśle fotograficznym. Nadzorował on produkcję klisz rentgenograficznych. I oto pewna partia tych klisz, po ich wywołaniu, dawała „efekt fasoli”. Ich powierzchnię pokrywały białe plamki. Przy bliższej analizie okazało się, że takie zepsute klisze uzyskiwano z produkcji otrzymywanej w środy każdego tygodnia. Czas, w którym zaczęły powstawać wadliwe klisze pokrywał się z czasem otwarcia w pobliżu nowych zakładów garbarskich. W zakładach tych w nocy z poniedziałku na wtorek opróżniano wielką kadź garbarską. Opowiadający szybko wykrył, że garbarska płukanka zawiera bardzo silne inhibitory czułości kliszy i odtwarza też „efekt fasoli”. To bardzo pouczająca historia. O tym, jak ostrożnym i czujnym musi być chemik, by zawsze umieć dostrzec nieznaną okoliczność, mogącą fatalnie wpłynąć na produkcję.

Następny rozdział („Wanad”) na powrót nawiązuje do Auschwitz. Oto uzyskiwana z Niemiec syntetyczna żywica daje niewysychającą czarną farbę przy mieszanii z sadzą. W odpowiedzi na reklamację przychodzi porada, by do żywicy dodać naftoesanu wanadu. Tę skuteczną radę podpisał jakiś doktor Müller. Kierując się pewnymi poszlakami Levi dochodzi czy nie jest to czasem chemik, nadzorujący pracę laboratorium w Auschwitz, zresztą zachowujący się w tym czasie przyzwoicie. Po upewnieniu się, że tak właśnie się rzeczy mają, nawiązuje z Müllerem korespondencję. Niemiec uparcie namawia go na spotkanie. Najwyraźniej chce uzyskać świadectwo, że sam zachowywał się przyzwoicie, a także rodzaj rozgrzeszenia wobec świata. Levi wzbrania się jednak. „Nie czułem się – pisze – na siłach, by mówić w imieniu zmarłych”. W końcu jednak ustępuje – ale nagłą śmierć Niemca uniemożliwia spotkanie. Tak więc, grzechy oświęcimskie pozostały nieodpuszczone.

Książkę zamyka rozdział „Węgiel”. Jest to poetycki opis wiecznej wędrówki węgla, ze świata nieożywionego do ożywionego i z powrotem, przez tysiące kolejnych wcieleń. Coś podobnego można by napisać i o innych pierwiastkach, ale węgiel jest tu może najbardziej wyrazisty. Ten poemat o wędrówce węgla to rodzaj ideowego i światopoglądowego przesłania autora. Odwołam się tu do wspomnień osobistych. Latem 1956 bodaj roku byłem na wczasach w Giżycku, organizowanych przez Związek Nauczycielstwa Polskiego. Przebywało tam między innymi dwóch bardzo już dla mnie wtedy starszych panów. Jeden właśnie na starość skończył studia pedagogiczne. Drugi, stary nauczyciel łaciny, był byłym księdzem. Obydwaj byli w wieku skłaniającym do rozmyślań o sensie życia. – „Wicie kolego – mówił łacinnik – mnie

osobiście zawsze pociesza świadomość tego wiecznego ruchu, stawania się i znikania, i powstawania czegoś nowego. Tej wiecznej transformacji świata”. Myślę, że odczucia łacinnika bardzo były bliskie doznawanym przez Levi’ego.

Bardzo szybko, pisząc tę notatkę, zdałem sobie sprawę, że piszę coś, co jest skróconą biografią pisarza. Bo też sama książka, o której tu mówimy, jest w gruncie rzeczy autobiografią pisarza, „podzieloną na pierwiastki chemiczne”.

W mojej skróconej wersji życiorysu nie dało się zawrzeć dziesiątków szczegółów, charakterystyk napotykanym ludzi i ich frapiących często sprawach. Starałem się natomiast oddać wiernie opinie pisarza, z zawodu chemika, którego zamiarem było wykazanie, że również przeżycia chemika mogą być interesującym tworzywem literackim oraz, że ich opis może zainteresować nawet laika. Czy się tak stało? Nie wiem. Natomiast jestem przekonany, że książka Levi’ego jest wielce interesująca dla chemika właśnie, który dzięki niej głębiej może poznać swój własny zawód i odkryć drzemiącą w jego głębi radość.

NOWE WYDAWNICTWA



Polimerowe kompozyty konstrukcyjne, Waław Królikowski, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2012, wyd. pierwsze, oprawa miękka, s. 332

W pierwszej połowie 2012 roku staraniem Wydawnictwa Naukowego PWN ukazała się książka pt. „Polimerowe kompozyty konstrukcyjne” autorstwa prof. dr inż. Waława Królikowskiego. Prof. Waław Królikowski jest niekwestionowanym autorytetem w zakresie kompozytowych materiałów polimerowych, nestorem wśród technologów zajmujących się przetwórstwem i stosowaniem tłoczyw poliestrowych czy też wytwarzaniem i zastosowaniem nienasyconych żywic poliestrowych wzmocnianych włóknami szklanymi, zwanych zwyczajowo, laminatami poliestrowymi. Książka, jak sam Autor stwierdza w przedmowie, stanowi rozszerzoną wersję kursu „Polimerowe kompozyty konstrukcyjne” będącego ofertą dydaktyczną w Zachodniopomorskim Uniwersytecie Technologicznym w Szczecinie. Wbrew sugestiom Autora, wynikającym z jego skromności, jest to bardzo kompletna monografia obejmująca prawie wszystkie zagadnienia związane z wieloskładnikowymi materiałami kompozytowymi. Wystarczy porównać skrypt „Tworzywa wzmocnione i włókna wzmocniające” tegoż Autora, wydany przez Politechnikę Szczecińską w 1984, by przekonać się jaką drogę przebyły w tym okresie polimerowe kompozyty, jak bardzo zmieniły się materiały inżynierskie dostępne inżynierom i projektantom, jak bardzo zmienił się otaczający nas świat. Warto też wspomnieć, że prof. Waław Królikowski jest współautorem wielu wznawianych wydań książki „Nienasycone żywice poliestrowe”, zawierającej mnóstwo wiedzy na temat podstawowego składnika kompozytów polimerowych jakim jest faza ciągła kompozytu powstała z usieciowania (utwardzenia) ciekłej początkowo żywicy poliestrowej.

Książka zawiera 9 rozdziałów, w kolejności: 1) Wiadomości wstępne o kompozytach, 2) Polimery, 3) Napełniacze i wzmocnienia, 4) Materiały lekkie do kompozytowych konstrukcji przekładkowych, 5) Struktura i właściwości kompozytów polimerowych, 6) Metody technologiczne wytwarzania wyrobów kompozytowych, 7) Nanokompozyty polimerowe, 8) Polimery samowzmocnione oraz 9) Podstawy obliczeń i projektowania konstrukcji.

W pierwszym rozdziale znajdujemy szereg podstawowych definicji, klasyfikację kompozytów uwzględniającą typ fazy rozproszonej, rodzaje kompozytów ze względu na typ matrycy. W tej części Autor wymienia szereg kompozytów funkcjonalnych takich jak np. kompozyty barierowe, magnetyczne, antibakteryjne itp., ale wiodącym tematem książki są kompozyty konstrukcyjne o bardzo dobrych właściwościach wytrzymałościowych, które służą do wytwarzania różnych elementów konstrukcyjnych poczynając od części i obudów maszyn, przedmiotów codziennego użytku, konstrukcji budowlanych, karoserii samochodowych, łodzi i jachtów, zaawansowanego technologicznie sprzętu do wyczynowego uprawiania

sportu itd. Cieszy fakt, że Autor konsekwentnie używa terminu matryca dla określenia fazy ciągłej – łączącej – nadającej kształt i wygląd wyrobu. Tu analogia do anglojęzycznego terminu „matrix” jest oczywista i zapewne mniej kontrowersyjna do stosowanego niekiedy innego określenia tej fazy, „osnowa”.

Kompozyty są przedmiotem zainteresowania głównie trzech grup zawodowych: chemików, technologów przetwórców oraz mechaników. Każdy przedstawiciel jednej z tych grup ma inny profil wykształcenia, inny poziom wiedzy pozwalający w różnym stopniu zrozumieć istotę wzrostu wytrzymałości materiału stanowiącego połączenie polimeru charakteryzującego się właściwościami lepkosprężystymi z włóknem wzmacniającym o dużym module sprężystości. Książka „Polimerowe kompozyty konstrukcyjne” jest tak napisana i tak komplementarna, że z całą pewnością zadowoli czytelnika deklarującego przynależność do każdej z wymienionych grup. Mechanik znajdzie w książce rozdziały przedstawiające w sposób jasny i precyzyjny budowę topologiczną polimerów, opis konformacji łańcucha polimerowego, charakterystykę polimerów amorficznych i semikrystalicznych, opis właściwości szeregu polimerów od wielkotonazowych poliolefin po konstrukcyjne termoplasty takie jak PET, PBT, PC czy poliamidy. Chemik poszerzy swoją wiedzę na temat włókien, mat, preform, tkanin i dzianin, różnego rodzaju przędz wykonanych nie tylko z włókien szklanych, ale także włókien węglowych. Dla tej grupy czytelników z całą pewnością interesujący będzie rozdział przedstawiający podstawy obliczeń i projektowania konstrukcji kompozytowych, z reguły bliższy mechanikom i wymagający bardziej zaawansowanej wiedzy matematycznej i obliczeniowej. Wspomnieć tu można opis hipotez wytrzymałościowych takich jak kryterium maksymalnych naprężeń, kryterium maksymalnych odkształceń, kryterium Tsai-Hilla i kryterium Tsai-Wu.

Bardzo ważną część książki stanowi rozdział o technologiach wytwarzania kompozytów. Na ten temat dostępna w języku polskim literatura nie jest zbyt bogata. Prof. Wacław Królikowski podjął się trudu przybliżenia bardzo wielu technologii by wymienić tylko najważniejsze, takie jak technologie formowania infuzyjnego, metoda RTM, formowanie metodą RIM, formowanie z zastosowaniem autokławu, formowanie metodą pultruzji i inne.

Niektóre z rozdziałów mają swoje odpowiedniki w innych podręcznikach czy skryptach, np. opis wzmacniania kompozytów włóknami długimi, wyznaczanie długości krytycznej włókna ciętego, równanie kompozycji wiążące wytrzymałość kompozytu z udziałem objętościowym włókna. Książka zawiera także rozdziały opisujące najnowsze osiągnięcia inżynierii materiałowej, mianowicie rozdział o nanokompozytach polimerowych oraz polimerach samowzmocnionych. Rozdziały te nie są zbyt obszerne, mają charakter informacyjny, ale być może staną się impulsem do zainteresowania studentów politechnik tą tematyką.

Autor posługuje się poprawną terminologią, czemu trudno się dziwić, skoro jako nestor polskich specjalistów czy technologów zajmujących się kompozytami niejednokrotnie sam ją tworzył i popularyzował. W tym kontekście pewne zdziwienie budzi stwierdzenie Autora, że w języku polskim brak jest odpowiednika angielskiego terminu „crazes” czyli powstawania fibrylarnej struktury powstającej podczas plastycznej deformacji w określonych warunkach odkształceń lub w dwufazowych układach o podwyższonej udarności. Otóż od wielu już lat wielu polskich naukowców z powodzeniem używa w omawianym przypadku określenia „rysy (mikrorysy) naprężeniowe”. Termin ten na stałe przyjął się w polskich publikacjach.

Książka jest bardzo ładnie wydana, zawiera wiele wykresów, rysunków, zdjęć i tabel. W mojej skromnej ocenie stanowi bardzo dobry podręcznik dla studentów wydziałów chemicznych i mechanicznych politechnik, w tym takich kierunków kształcenia jak inżynieria materiałowa czy technologia chemiczna. Oczywiście powinna zainteresować również inżynierów pracujących w branży kompozytów, konstruktorów i przetwórców.

Reakcje kwasów i zasad w chemii analitycznej, Adam Hulanicki, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2012, wyd. czwarte zmienione, s. VIII+294, cena 36,70 zł.

Kolejne, długo wyczekiwane wydanie tego niezmiernie popularnego podręcznika chemii analitycznej, adresowanego przede wszystkim do studentów wydziałów chemicznych uniwersytetów i politechnik, zostało nieco tylko zmienione w porównaniu z poprzednim, sprzed ponad dwudziestu lat. W szczególności Autor dodał w kilku miejscach informacje dotyczące zastosowania komputerów i metod obliczeniowych do poruszanych zagadnień. Jak jednak sam zaznaczył we Wstępie, zadaniem tej książki jest raczej ułatwić zrozumienie zjawisk i procesów, a nie mechaniczne wykonywanie obliczeń.

Trudno jest recenzować książkę tak powszechnie znaną i uznaną. Sam zalecam ją swoim studentom na równi z klasycznymi podręcznikami chemii analitycznej. Jej zalety to m.in. przejrzysty i konsekwentny układ rozdziałów i spora liczba przykładowych zadań w połączeniu z wyczerpująco wyłożonymi zagadnieniami teoretycznymi. „Reakcje kwasów i zasad...” obejmują wprawdzie tylko fragment tematyki poruszanej na zajęciach z tego przedmiotu, ale jest to fragment bodaj najważniejszy, bo wprowadza studentów w obszary dotąd im zupełnie nieznanne i słabo rozumiane, przede wszystkim w równowagi jonowe w roztworach i ich wzajemne powiązania. Skądinąd zresztą są to problemy dotyczące chemii w ogóle, nie tylko w aspektach analitycznych.

Książkę rozpoczyna chemiczny elementarz, czyli prawo działania mas i teoria Debay'a-Hückla. Stałą równowagi Autor wyprowadza ze stałych szybkości reakcji – dobry wybór, ponieważ chemia analityczna jest wykładana studentom bez rozwiniętych podstaw chemii fizycznej. Dodano jednak rozdział („z gwiazdką”, tzn. dla bardziej zaawansowanych) wiążący stałe równowagi z innymi wielkościami termodynamicznymi. Takie – bardzo konsekwentne – stopniowanie i rozszerzanie wiadomości jest bardzo typowe dla stylu prof. Hulanickiego.

Trudno byłoby analizować „Reakcje kwasów i zasad...” rozdział po rozdziale, ale nie można nie wspomnieć o tych, które są szczególnie przydatne w pracy ze studentami. W mojej praktyce wykładowcy bardzo sprawdził się np. rozdział 2.10. „Substancje amfoteryczne”, który pokazuje, że samo pojęcie amfoteryczności jest względne i zależy od przyjętego progu rozpuszczalności. Inny taki rozdział to 3.7. „Pojemność buforowa” – student dowiaduje się, że buforem jest właściwie wszystko, jedynie pojemność buforowa jest czynnikiem różnicującym układy pod tym względem. Takich przykładów – perełek jest w książce wiele. Oczywiście nie są to tematy nowe i odkrywcze naukowo, natomiast istotny jest sposób podania wiedzy i ilustracja zagadnień. Innymi słowy mówiąc, mamy po prostu do czynienia z bardzo dobrym podręcznikiem akademickim.

Z punktu widzenia praktyki analitycznej ważne są takie tematy, jak obliczanie krzywych miareczkowania i skoków miareczkowania. Także one są wyłożone starannie i jasno. Mam jedynie uwagę do rozdziału 4.7. „Krzywe miareczkowania kwasów wieloprotonowych i mieszanin kwasów”. Jest to dość istotne dydaktycznie zagadnienie, ponieważ miareczkowanie np. H_3PO_4 za pomocą mianowanego roztworu NaOH jest typowym laboratoryjnym ćwiczeniem praktycznym wykonywanym na pracowni studenckiej. W tym rozdziale brak jest wyrazistego przykładu, pożądane byłoby także porównanie większej liczby krzywych o różnym charakterze. Polecałbym np. umieszczenie na jednym wykresie krzywych dla H_3PO_4 (dwa skoki, pierwszy i drugi) z kwasem winowym lub askorbinowym (jeden, trzeci skok), a w przypadku kwasów dwuprotonowych podobny zabieg dla kwasów szczawinowego (jeden, pierwszy skok), adypinowego (jeden, drugi skok) oraz askorbinowego (dwa skoki, ale pierwszy zbyt słaby, aby móc do niego dobrać wskaźnik). Takie porównanie jest doskonałym dowodem, że miareczkowanie ma sens tylko jeśli najpierw obliczymy najpierw krzywą miareczkowania! Oczywiście dodatkowym aspektem jest tu dobór wskaźników, także nieraz niemożliwy bez znajomości krzywej.

Książkę zamykają rozdziały poświęcone innym (niż Brønsteda) teoriom kwasów i zasad, wyłożone wyczerpująco lecz jasno.

Pod względem edytorskim książkę wydano starannie, niewiele jest błędów (ale się trafiają, np. na str. 4 brak drugiej potęgi we wzorze 1.15; „jon obojnacny” zamiast „jon obojnaczy” na str. 42).

Z niedociągnięć – niezbyt istotnych, ale jednak – wymieniłbym brak wyjaśnienia buforujących właściwości amfolitów (jeśli pominąć wzmiankę na str. 120), a także nieumieszczenie w spisie literatury uzupełniającej popularnych podręczników z chemii analitycznej Minczewskiego i Marczenki, Lipca i Szmala, Cygańskiego, Galusa i in. Wśród nich wzrastającym zainteresowaniem cieszy się wydany niedawno amerykański podręcznik Skooga, także wart zauważenia i wzmianki, choćby ze względu na oryginalny układ i wiele dodatkowych, „pozapodręcznikowych” informacji i ciekawostek.

Niezależnie od powyższych uwag trzeba jednakże wyraźnie stwierdzić, że podręcznik prof. Adama Hulanickiego jest jedną z najwartościowszych pozycji wśród podobnych na naszym rynku wydawniczym i że jego wznowienie jest bardzo dobrą wiadomością dla wykładowców chemii analitycznej w polskich uczelniach.

Jacek Gliński

INFORMACJE

INFORMACJE REDAKCJI „WIADOMOŚCI CHEMICZNYCH”

CENY PRENUMERATY NA ROK 2012

Redakcja miesięcznika PTCh „Wiadomości Chemiczne” zawiadamia, że wysokość prenumeraty rocznej „Wiadomości Chemicznych” za 2012 r. będzie wynosiła **180 zł** dla instytucji i niezrzeszonych prenumeratorów indywidualnych. Dla członków PTChem **20 zł**. Należność za prenumeratę prosimy przekazywać na konto:

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

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

- prenumerata „Wiadomości Chemicznych” na rok 2012 wraz ze składką członkowską, w ramach której dostarczany jest „Orbital”, wynosi **70 zł** (składka – 50 zł, prenumerata – 20 zł);
- emeryci, doktoranci oraz studenci płacą **35 zł** (składka – 15 zł, prenumerata – 20 zł); a nauczyciele szkół średnich i podstawowych płacą **40 zł** (składka – 20 zł, prenumerata – 20 zł).

Członkowie PTCh, którzy zechcą zaprenumerować „Wiadomości Chemiczne” na podanych tu warunkach, proszeni są o wnoszenie opłat na konto:

PTCh Warszawa, ul. Freta 16
Millennium BIG BG SA
NRB 57 1160 2202 0000 0000 2720 2458

Wyróżnione prace doktorskie lub habilitacyjne

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Skorygowana nomenklatura rodników, jonów, jonorodników i podobnych indywidualności chemicznych. Zalecenia 1993, red. T. Sokołowska i A. Wiśniewski, cena 15 zł

I.Z. Siemion, *Lutum sapientiae, czyli Notatek chaotycznych część pierwsza*, cena 18 zł

M. Zabłocka-Malicka, *Ruchliwość jonów w podwójnych układach stopionych soli*,
cena 8 zł.

Praca zbiorowa, *Nanomateriały*, red. D. Hreniak, W. Łojkowski, W. Stręć, M. Suszyńska, cena 25 zł.

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

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

Od substancji prostych do życia. Świat RNA – początki życia na Ziemi, Zdzisław Chilmonczyk – NAKŁAD WYCZERPANY.

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

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

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

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

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

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

REGULAMIN DLA AUTORÓW

„Wiadomości Chemiczne” publikują artykuły przeglądowe, dotyczące wszystkich dziedzin chemii i wcześniej niedrukowane w innych czasopismach. Prace raz opublikowane w „Wiadomościach Chemicznych”, bez zgody Redakcji, nie mogą być wydane gdzie indziej. Treść artykułów powinna odpowiadać aktualnemu stanowi wiedzy i uwzględniać najnowsze osiągnięcia z dziedziny, której artykuł dotyczy.

Ponadto w serii „Biblioteka Wiadomości Chemicznych” publikowane są prace, będące z założenia dłuższymi artykułami przeglądowymi lub monografiami poświęconymi ważnym i aktualnym problemom współczesnej chemii. Autorzy, którzy chcieliby taki artykuł napisać, powinni wcześniej skontaktować się z Redakcją.

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

Prace należy przysyłać do Redakcji pocztą elektroniczną na adres: bstran@wchuwr.pl lub wchem@wchuwr.pl.

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

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

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

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

Rysunki mogą być kolorowe, ale wówczas należy liczyć się z dopłatą do druku. Muszą mieć odpowiednią formę graficzną, by w razie potrzeby nadawały się do reprodukcji. W osobnym pliku prosimy dołączyć podpisy pod rysunki w języku polskim i angielskim. Rysunki czarno-białe należy zapisać w formacie .doc, .cdr, .jpg, .tif, .pdf, natomiast rysunki kolorowe – w formacie .jpg lub .tif. Rozdzielczość rysunków ≥ 300 dpi. Każdy z rysunków należy zapisać w oddzielnym pliku.

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

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

O **przyjęciu** pracy do druku decyduje Komitet Redakcyjny. Przed podjęciem decyzji wszystkie prace są recenzowane przez dwóch niezależnych recenzentów, zgodnie ze wskazówkami zawartymi w broszurze informacyjnej Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (http://www.nauka.gov.pl/fileadmin/user_upload/ministerstwo/Publikacje/20110216_MNISW_broszura_210x210.pdf), oraz z uwzględnieniem instrukcji zamieszczonych na portalu Polska Bibliografia Naukowa (<https://pbn.nauka.gov.pl>)

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