



75
LAT



PATRONAT JM REKTORA
ŚLĄSKIEGO UNIwersYTETU
MEDYCZNEGO W KATOWICACH

IV Seminarium Ogólnoakademickie

„Metody fizykochemiczne
w badaniach naukowych”

MONOGRAFIA POKONFERENCYJNA

Poznań 2023



Śląski
Uniwersytet
Medyczny
w Katowicach

ORGANIZATOR

Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej

Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec,
tel.: +48 32 364 15 80-82

<http://seminariumogolnoakademickie.sum.edu.pl/>

<http://farmacjafizyczna.sum.edu.pl/>

farmacjafizyczna@sum.edu.pl

PATRONAT HONOROWY

JM Rektor

Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

Prof. dr hab. n. med. Tomasz Szczepański

Redakcja naukowa

dr Jędrzej Nyćkowiak

Wydawca

Młodzi Naukowcy

www.mlodzinaukowcy.com

wydawnictwo@mlodzinaukowcy.com

ISBN: 978-83-66743-98-4

Ilość znaków w książce: 280 tys.

Ilość arkuszy wydawniczych: 7

Data wydania: wrzesień 2023

Rozdziały zostały wydrukowane zgodnie z przesłanymi tekstami po ich zaakceptowaniu przez recenzentów. Odpowiedzialność za zgodne z prawem wykorzystanie użytych materiałów ponoszą autorzy poszczególnych rozdziałów.

MONOGRAFIA POKONFERENCYJNA

Poznań 2023



Spis treści

1. Wpływ warunków chromatograficznych na wykrywanie i oznaczanie kwasu elagowego	
<i>Zuzanna Hartwig, Małgorzata Dołowy</i>	7
2. Zastosowanie metod fluorescencyjnych w badaniach biomedycznych	
<i>Imiołek Elwira, Wiejak Marta, Kempys Karolina, Korzonek Kamila, Piechaczek Karolina, Sulik Agnieszka, Słowiacek Karolina, Janikowska Grażyna</i>	15
3. Spektroskopowa analiza oddziaływania związku o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym z głównym białkiem transportującym surowicy – badania wstępne	
<i>Piordas Katarzyna, Piśła Patrycja, Owczarzy Aleksandra, Maciążek-Jurczyk Małgorzata</i>	22
4. Zastosowanie spektroskopii UV-Vis w badaniach środowiskowych - oznaczenie stężenia jonów żelaza oraz pH wód stojących znajdujących się na terenie Ośrodka Edukacji Ekologiczno-Geologicznej GEOsfera w Jaworznie	
<i>Rogóż Wojciech, Górniak Nicole, Owczarzy Aleksandra, Chečko Agnieszka, Maciążek-Jurczyk Małgorzata</i>	28
5. Badania 6-acetyloaminobutylo-9-chlorochino[3,2-b]benzo[1,4]tiazyny i próba jej enkapsulacji w nanocząstkach albuminy surowicy ludzkiej. Pilotażowa analiza spektroskopowa.	
<i>Sarkowicz Patrycja, Kulig Karolina, Maciążek- Jurczyk Małgorzata</i>	35
6. Wyznaczanie granicy wykrywalności i oznaczalności drospirenonu metodą TLC z densytometrią	
<i>Weronika Starego, Małgorzata Dołowy</i>	43
7. Identyfikacja zmian konformacyjnych glikowanej albuminy w obecności kwasów tłuszczowych metodą II pochodnej widma absorpcyjnego i fluorescencyjnego	
<i>Szkudlarek Agnieszka</i>	51
8. Kwasy tłuszczowe jako inhibitory produktów glikacji albuminy surowicy krwi ludzkiej	
<i>Szkudlarek Agnieszka</i>	57
9. Fizykochemiczne i biomedyczne właściwości cytochromu P450	
<i>Trzaska Sabina, Chadryś Katarzyna, Wiejak Marta, Światała Zuzanna, Wnęk Zuzanna, Szwabowicz Izabella, Dudkiewicz Karolina, Janikowska Grażyna</i>	63
10. Pilotażowe spektroskopowe badania oddziaływań wybranej substancji o potencjalnym działaniu antyproliferacyjnym z HSA i AGP. Badania <i>in vitro</i>	
<i>Trzepacz Monika, Owczarzy Aleksandra, Kulig Karolina, Rogóż Wojciech, Maciążek-Jurczyk Małgorzata</i>	69
11. Kolagen – właściwości fizykochemiczne i zastosowanie biomedyczne	
<i>Wiejak Marta, Trzaska Sabina, Koch Milena, Witek Konrad, Lewicka Natalia, Śliz Magdalena, Ogórek Tiara, Janikowska Grażyna</i>	75

1. Wpływ warunków chromatograficznych na wykrywanie i oznaczanie kwasu elagowego

Zuzanna Hartwig⁽¹⁾, Małgorzata Dołowy⁽²⁾

⁽¹⁾ Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Chemii Analitycznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec,

⁽²⁾ Zakład Chemii Analitycznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec

Słowa kluczowe: densytometria, LOD, LOQ, polifenole, TLC

Streszczenie

Kwas elagowy (KE) to przedstawiciel pochodnych fenoli wykazujących różne właściwości biologiczne, w tym działanie antyoksydacyjne. Z uwagi na cenne właściwości KE, które mogą być potencjalnie wykorzystywane w profilaktyce i leczeniu różnych schorzeń, w niniejszej pracy przeprowadzono liczne badania chromatograficzne mające na celu opracowanie szybkiej i ekonomicznej metody chromatografii cienkowarstwowej (TLC) do wykrywania i oznaczania kwasu elagowego jako potencjalnego surowca farmaceutycznego i kosmetycznego. Badania obejmowały również dobór odczynnika wywołującego badany związek czyli umożliwiającego jego efektywną detekcję. W ramach przeprowadzonych analiz chromatograficznych przetestowano roztwory wybranych soli nieorganicznych oraz barwników organicznych jako kandydatów na nowe i efektywne odczynniki wywołujące kwas elagowy. Uzyskane w pracy wyniki potwierdzają wpływ różnych warunków chromatograficznych na wykrywanie i ilościowe oznaczanie tego związku. Stwierdzono, że najmniejszą ilość kwasu elagowego można wykryć i oznaczyć ilościowo za pomocą układu chromatograficznego składającego się z płytek pokrytych żelazem krzemionkowym RP18F₂₅₄ oraz fazy ruchomej złożonej z propan-2-olu i wody (35:15, v/v). Ponadto w pracy tej wykazano przydatność pięciu nowych odczynników wywołujących takich jak: zieleń brylantowa, zieleń malachitowa, azotan (V) miedzi (II), zieleń metylova i siarczan (VI) niklu (II) do wykrywania badanego KE. Zaprezentowane w pracy warunki chromatograficzne do identyfikacji i ilościowego oznaczania kwasu elagowego mogą być w przyszłości wykorzystane w kontroli jakości surowców lub preparatów zawierających ten polifenol.

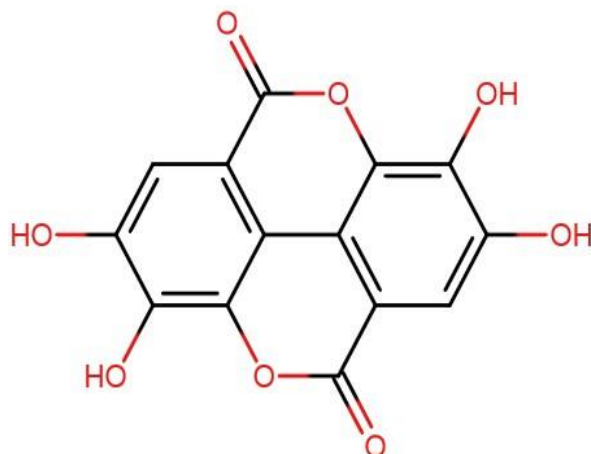
1. Wstęp

Związki fenolowe to wtórne produkty metabolizmu roślin, które posiadają zróżnicowaną budowę chemiczną oraz masę cząsteczkową. Ponadto różnią się one między sobą właściwościami biologicznymi, chemicznymi i fizycznymi. W przyrodzie występują w różnych częściach roślin np. korze, liściach, kwiatach i owocach (Majtkowski, Balcerek, Majtkowska 2016). Do tej grupy związków zalicza się m.in.: flawonoidy, kwasy fenolowe, alkohole fenolowe, fenylopropanoidy, lignany oraz stilbeny. W roślinach pełnią one m.in. działanie antyoksydacyjne, przeciwzapalne, przeciwniażdżycowe oraz przeciwnowotworowe. Ponadto działają także przeciwdrobnoustrojowo na bakterie, wirusy i grzyby (Majtkowski, Balcerek, Majtkowska 2016). Jako jedno z najważniejszych ich działań i zastosowań uznaje się działanie antyoksydacyjne tj. ograniczające powstawanie reaktywnych form tlenu oraz wolnych rodników. Z tego powodu fenole znajdują coraz większe zastosowanie w lecznictwie. Obserwuje się ich obecność w produktach leczniczych pochodzenia naturalnego, mieszkankach ziołowych oraz w preparatach dermatologicznych (Majtkowski, Balcerek, Majtkowska 2016).

Przedstawicielem omawianych polifenoli jest kwas elagowy, czyli 2,3,7,8-tetrahydroksy-chromeno[5,4,3-cde]chromeno-5,10-dion o wzorze strukturalnym przedstawionym na Rys. 1.

Kwas elagowy wytwarzany jest w roślinach w znacznym stopniu w wyniku hydrolizy elagotanin, które są wtórnymi metabolitami. Największym źródłem kwasu elagowego są jeżyny, maliny, a także truskawki, granaty, orzechy włoskie i winogrona. Posiada on dużą aktywność

biologiczną (Kalinowska i in. 2020). Działa on antyoksydacyjnie, przeciwzapalnie, przeciwnowotworowo, przeciwcukrzycowo, kardioprotekcyjnie oraz neuroprotekcijnie (Zhu et al. 2022; Shariff-Red et al. 2022).



Rys. 1. Wzór strukturalny kwasu elagowego.

Z uwagi na te cenne właściwości i wielokierunkowy działanie na organizm ludzki omawianych związków, w tym również kwasu elagowego, analiza zawartości fenoli w żywności, lekach i kosmetykach cieszy się obecnie dużym zainteresowaniem (Kalemba-Dróżdż i in. 2022). Właściwości polifenoli są szeroko badane na całym świecie ze względu na wiele możliwości ich zastosowania w medycynie, farmakologii, kosmetologii, dietetyce, a także w rolnictwie (Kalinowska i in. 2020).

Wykonany przegląd literaturowy świadczy o tym, że wśród najbardziej popularnych metod analitycznych, do oznaczania związków fenolowych na przykład w żywności jest spektrofotometria UV-Vis (Pueyo, Calvo 2009; Pieszko, Zaremba 2013; Sadecka, Tothova 2012; Bala et al. 2006, Szmagara i in. 2019). Z kolei do wykrywania kwasu elagowego w różnych ekstraktach i tradycyjnych produktach stosowano także metody chromatograficzne, takie jak chromatografia cienkowarstwowa oraz wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) (Bagul et al. 2005, He et al. 2019; Bala et al. 2006).

Ze względu na możliwości wykorzystania KE w profilaktyce i leczeniu różnych schorzeń, istotne jest opracowanie szybkiej i ekonomicznej metody chromatograficznej, zarówno do wykrywania jak i oznaczania kwasu elagowego w produktach leczniczych, co stało się nadrzędnym celem niniejszej pracy. Głównymi założeniami tej pracy było: przebadanie różnych układów chromatograficznych do TLC i wybór tego najbardziej optymalnego do wykrywania i oznaczania badanego kwasu elagowego, wybór efektywnego odczynnika wywołującego kwas elagowy do jego detekcji oraz określenie granicy oznaczalności kwasu elagowego nowo opracowaną metodą TLC z densytometrią.

2. Materiał i Metody

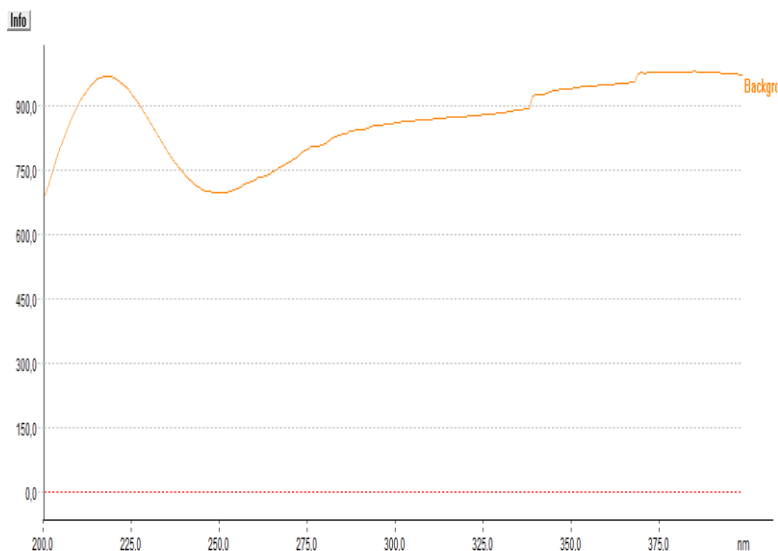
Podczas przeprowadzonych w pracy badań chromatograficznych stosowano wzorec kwasu elagowego w postaci substancji o czystości min. 95% Sigma-Aldrich (USA) z którego sporządzano metanolowy roztwór o stężeniu 5 mg ml⁻¹. Jako składniki faz ruchomych wykorzystanych w analizie chromatograficznej użyto następujących rozpuszczalników o czystości chromatograficznej (tj. HPLC), produkcji Sigma-Aldrich (USA) lub odpowiednio Avantor (Polska): metanol, toluen, lodowaty kwas octowy, octan etylu, chloroform, etanol 96%, propan-2-ol i acetonitryl. Natomiast wodę oczyszczoną wytwarzano w Zakładzie Chemii Analitycznej Wydziału Nauk Farmaceutycznych SUM w Sosnowcu. Pozostałymi odczynnikiemami stosowanymi w niniejszych badaniach kwasu elagowego były roztwory (2-5% wodne lub alkoholowe) barwników organicznych lub soli

nieorganicznych jako odczynników wywołujących kwas elagowy. W tym celu wykorzystano m.in.: roztwór chlorku żelaza (III), roztwór azotanu (V) miedzi (II), roztwór siarczanu (VI) niklu (II), roztwór błękitu brylantowo-krezolowego, roztwór błękitu tymolowego, roztwór zieleni brylantowej, roztwór eoyny żółtej, roztwór czerwieni fenolowej, roztwór czerwieni krezolowej, roztwór zieleni metylowej oraz roztwór zieleni malachitowej. Jako materiały chromatograficzne stosowano płytki do chromatografii cienkowarstwowej produkcji E. Merck (Niemcy) pokryte następującymi nośnikami: żelem krzemionkowym RP18F₂₅₄, żelem krzemionkowym RP18WF₂₅₄, żelem krzemionkowym RP8F₂₅₄, mieszaniną żelu krzemionkowego 60 i ziemi okrzemkowej F₂₅₄ oraz żelem krzemionkowym 60F₂₅₄ (aluminiowe oraz szklane). Do nanoszenia roztworów kwasu elagowego na płytki używano mikropipety o pojemności 5 µl również firmy Camag (Szwajcaria). Płytki rozwijano w określonej fazie ruchomej w komorach chromatograficznych o wymiarach 20x10 cm firmy Camag (Szwajcaria). Natomiast do obserwacji postępów wykonywanych analiz chromatograficznych stosowano lampę UV i λ=254 nm (Camag, Szwajcaria). Z kolei do pomiaru powierzchni plamek kwasu elagowego badanego w różnych warunkach chromatograficznych używano densytometr CD60 firmy DESAGA-Panalytica (Niemcy). W początkowej fazie badań kwasu elagowego przebadano różne warunki chromatograficzne, które umożliwiły efektywną detekcję badanego związku tj. uzyskanie zwartych, symetrycznych plamek dobrze widocznych na chromatogramie TLC. Łącznie przetestowano 10 różnych układów do TLC złożonych z trzy- lub dwuskładnikowych mieszanin jako faz ruchomych oraz płytek rekomendowanych zarówno do chromatografii adsorpcyjnej jak i podziałowej. Fazę ruchomą stanowiły mieszaniny: toluen+octan etylu +lodowaty kwas octowy (25:24:1, v/v/v), toluen+ octan etylu+ kwas octowy (6:6:1,5, v/v/v), metanol+ woda (40:10, v/v), chloroform+metanol (45:5, v/v), propan-2-ol+woda (40:10, v/v), etanol+woda (35:14, v/v), etanol+ woda (35:15, v/v), acetonitryl+woda (42:8, v/v) i propan-2-ol+woda (35:15, v/v). W wyborze najlepszych warunków chromatograficznych posłużono się współczynnikiem opóźnienia (R_{fKE}) badanego kwasu elagowego i oceniano jego wartość uzyskaną w tych różnych warunkach chromatograficznych. Za najlepsze uznano te warunki, które zapewniły optymalną wartość R_f kwasu elagowego. Podczas dalszych badań mających na celu wyznaczenie granicy wykrywalności i oznaczalności stosowano płytki o wymiarach 10x20 cm, na które nanoszono za pomocą specjalistycznej mikropipety roztwór wzorcowy kwasu elagowego w metanolu o różnym stężeniu tj. w zakresie od 1mg ml⁻¹ do 0,16 mg ml⁻¹. Każdy roztwór nanoszono w ilości 5 mikrolitrów trzykrotnie, a płytkę rozwijano za pomocą ww. faz ruchomych na wysokość 7,5 cm. Uzyskane na chromatogramach plamki kwasu elagowego dla różnych stężeń tego związku poddawano skanowaniu densytometrycznemu przy długości fali 217 nm. Otrzymane w wyniku tego powierzchnie plamek kwasu (P_{KE}) wykorzystano do wyznaczenia liniowych zależności $P_{KE} = f(c_{KE})$, gdzie c_{KE} to zawartość kwasu elagowego w mikrogramach w przeliczeniu na plamkę. Parametry tych równań takie jak SE-odchylenie standardowe otrzymanej liniowej korelacji i współczynnik kierunkowy tej krzywej (a), w dalszym etapie posłużyły do oszacowania najmniejszej ilości kwasu elagowego jaką można wykryć i dalej oznaczyć techniką TLC w tych zastosowanych warunkach czyli do obliczenia wartości granicy wykrywalności (LOD_{KE}) oraz granicy oznaczalności (LOQ_{KE}) w mikrogramach na plamkę wg wzoru $LOD_{KE} = 3,3 \times SE \times a^{-1}$ oraz $LOQ_{KE} = 10 \times SE \times a^{-1}$.

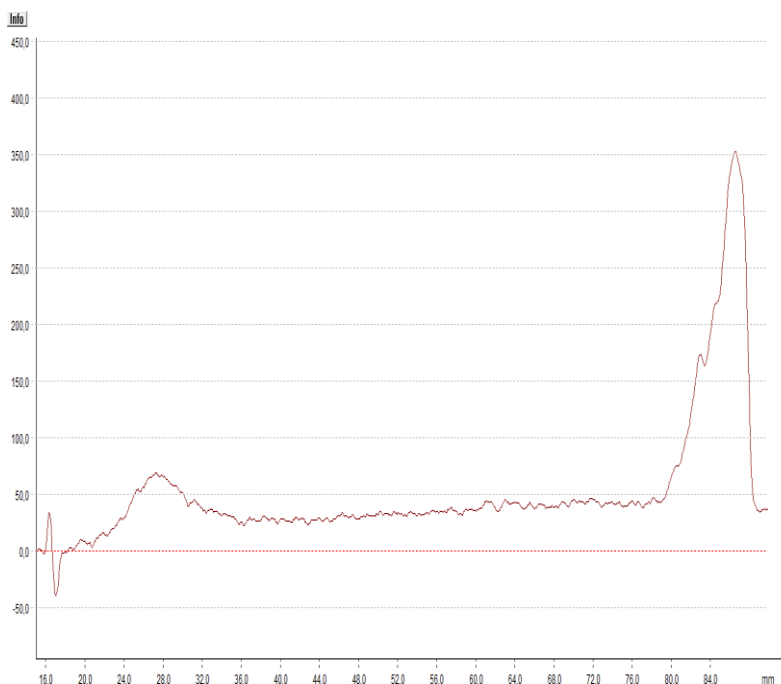
3. Wyniki

Analiza densytometryczna badanego kwasu elagowego w postaci jego metanolowego roztworu była możliwa dzięki jego zdolności do absorpcji promieniowania w świetle UV z maksimum przy długości fali λ=217 nm. Na poniższym rysunku – Rys. 2 zaprezentowano przykładowy spektrodensytogram kwasu elagowego wykonany w zakresie 200-600 nm za pomocą densytometru.

Natomiast na Rys. 3 przedstawiono wybrany densytogram kwasu elagowego. Zaprezentowane powyżej; spektrodensytogram oraz densytogram (Rys. 2 i 3) uzyskano na drodze skanowania (λ=217 nm) płytki pokrytej żelem RP8F₂₅₄ na której naniesiono roztwór badanego związku i następnie rozwijano ją za pomocą mieszaniny o składzie metanol+ woda (40+10, v/v) jako fazy ruchomej.



Rys. 2. Widmo roztworu metanolowego kwasu elagowego.



Rys. 3. Przykładowy densytogram kwasu elagowego.

W tabeli 1 (Tab. 1) zaprezentowano obserwacje z badań dotyczących doboru nowych odczynników wywołujących do wykrywania czyli identyfikacji badanego kwasu elagowego na chromatogramach w postaci charakterystycznych plamek.

Natomiast w Tab. 2 przedstawiono średnie wartości LOD_{KE} i LOQ_{KE} tj. odpowiednio granicy wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ) badanego związku w mikrogramach na plamkę uzyskane dla najlepszych czyli uznanych za optymalne warunków chromatograficznych.

Tab. 1. Wyniki doboru odczynników wywołujących kwas elagowy.

Zastosowany odczynnik wywołujący	Tło chromatogramu	Barwa plamki kwasu elagowego
Roztwór FeCl ₃	Jasnożółte	Fioletowa
Błękit brylantowo-krezolowy	Niebieskie	Niewidoczna
Błękit tymolowy	Ciemnoniebieskie	Niewidoczna
Zieleń brylantowa	Turkusowe	Żółta
Eozyna żółta	Różowe	Niewidoczna
Czerwień fenolowa	Żółte	Niewidoczna
Czerwień krezolowa	Ciemnożółte	Niewidoczna
Roztwór Cu(NO ₃) ₂	Jasnoniebieskie	Żółta
Zieleń metylowa	Jasnoniebieskie	Żółta
Zieleń malachitowa	Jasnoniebieskie	Żółta
Roztwór NiSO ₄	Bładoniebieskie	Żółta

Tab.2. Wartości LOD_{KE} i LOQ_{KE} otrzymane w różnych warunkach chromatograficznych metodą TLC-densytometria.

Faza ruchoma stosowana w analizie kwasu elagowego	Płytki chromatograficzne	Średnia wartość LOD _{KE} [µg KE na plamkę]
metanol+woda (40+10, v/v)	żel krzemionkowy RP18WF ₂₅₄	0,468
	żel krzemionkowy RP18F ₂₅₄	0,317
	żel krzemionkowy RP8F ₂₅₄	0,627
etanol+woda (35+15, v/v)	Żel krzemionkowy RP18WF ₂₅₄	0,541
	żel krzemionkowy RP18F ₂₅₄	0,175
	żel krzemionkowy RP8F ₂₅₄	0,307
propan-2-ol + woda (35+15, v/v)	żel krzemionkowy RP18WF ₂₅₄	0,552
	żel krzemionkowy RP18F ₂₅₄	0,072
	żel krzemionkowy RP8F ₂₅₄	0,565
acetonitryl+ woda (42+8, v/v)	żel krzemionkowy RP18WF ₂₅₄	0,521
	żel krzemionkowy RP18F ₂₅₄	0,499
	żel krzemionkowy RP8F ₂₅₄	0,476
Skład fazy ruchomej stosowanej w analizie kwasu elagowego	Płytki chromatograficzne	Średnia wartość LOQ _{KE} [µg KE na plamkę]
metanol+woda (40+10, v/v)	żel krzemionkowy RP18WF ₂₅₄	1,418
	żel krzemionkowy RP18F ₂₅₄	0,962
	żel krzemionkowy RP8 F ₂₅₄	1,899
etanol+woda (35+15, v/v)	żel krzemionkowy RP18WF ₂₅₄	1,642
	żel krzemionkowy RP18F ₂₅₄	0,530
	żel krzemionkowy RP8F ₂₅₄	0,930
propan-2-ol + woda (35+15, v/v)	żel krzemionkowy RP18WF ₂₅₄	1,674
	żel krzemionkowy RP18F ₂₅₄	0,218
	żel krzemionkowy RP8 F ₂₅₄	1,712
acetonitryl+ woda (42+8, v/v)	żel krzemionkowy RP18WF ₂₅₄	1,530
	żel krzemionkowy RP18F ₂₅₄	1,513
	żel krzemionkowy RP8F ₂₅₄	1,442

4. Dyskusja

Dokonany w pracy przegląd literaturowy potwierdził, że istnieją nieliczne tylko opisane warunki do identyfikacji badanego kwasu elagowego w różnych surowcach roślinnych czy preparatach stosowanych w medycynie tradycyjnej zawierającej ten związek (Agrawal and Kulkarni, 2020). I tak na przykład do identyfikacji kwasu elagowego w wywarze z *Ashwagandharishta* stosowano metodę TLC i czteroskładnikową fazę ruchomą toluen+octan etylu+kwas mrówkowy+metanol (9:9:3:0,6, v/v/v) (Agrawal i Kulkarni, 2020). Podobnie stosując trzyskładnikową fazę ruchomą zawierającą toluen+octan etylu+kwas mrówkowy (6:6:1,5, v/v/v) wykrywano badany związek w ekstrakcie z innego surowca roślinnego o nazwie *Syzygium cumini seed* czy odpowiednio w próbce ekstraktu z *Manjisthandi churna* za pomocą mieszaniny toluen+octan etylu+metanol+kwas mrówkowy (10:9:6:5, v/v/v/v). Detekcję KE prowadzono w świetle UV tj. w zakresie $\lambda=270-280$ nm (Agrawal i Kulkarni, 2020). Powyższe dane stały się przesłanką do przeprowadzenia badań zaprezentowanych w niniejszej pracy. Zgodnie z jej założeniami ważnym celem licznie przeprowadzonych doświadczeń było opracowanie optymalnych warunków chromatograficznych do analizy kwasu elagowego metodą TLC, tj. takich, które umożliwiłyby szybką i efektywną detekcję oraz oznaczanie zawartości tego związku w postaci metanolowego roztworu. Dużą uwagę poświęcono doborowi składników faz ruchomych stosowanych w tych badaniach. Przede wszystkim dążono do zastosowania jako składników faz ruchomych rozpuszczalników przyjaznych dla środowiska, nietoksycznych w porównaniu do składu faz ruchomych opracowanych już wcześniej przez autorów innych prac do analizy kwasu elagowego wyodrębnianego z surowca roślinnego (Agrawal i Kulkarni, 2020). W tamtych przypadkach używano wieloskładnikowe fazy ruchome, w których podstawowym komponentem był toluen i kwas mrówkowy. Zaproponowane w obecnej pracy fazy ruchome są dwuskładnikowe i oparte na bardziej przyjaznych środowisku rozpuszczalnikach np. etanolu lub odpowiednio propan-2-olu. Podczas wstępnego etapu badań przetestowano różnorodne fazy ruchome i sorbenty w postaci płytek do adsorpcyjnej chromatografii cienkowarstwowej oraz układu faz odwróconych. W toku prowadzonych analiz chromatograficznych KE zaobserwowano, że zaproponowane fazy ruchome w postaci mieszanin trzyskładnikowych zawierające w swoim składzie toluen oraz odpowiednio octan etylu i lodowaty kwas octowy lub odpowiednio kwas mrówkowy 0,1% w połączeniu z płytkami do chromatografii adsorpcyjnej pokrytymi samym żelem krzemionkowym 60F₂₅₄ i odpowiednio jego mieszaniną z ziemią okrzemkową F₂₅₄ są nieprzydatne do wykrywania kwasu elagowego w postaci roztworu metanolowego. W warunkach tych plamki KE pozostawały na starcie czyli osiągały współczynnik opóźnienia $R_{fKE}=0,0$. Dalsze badania kwasu elagowego, które przebiegały z użyciem kolejnych dwuskładnikowych faz ruchomych zawierających metanol, etanol, propan-2-ol lub acetonitryl oraz wodę w odpowiednim stosunku objętościowym (40+10; 35+15; 42+8) oraz płytek pokrytych żelem krzemionkowym RP8F₂₅₄, RP18WF₂₅₄ i RP18F₂₅₄ przeznaczonych głównie do chromatografii w odwróconym układzie faz wpłynęły na wzrost wartości współczynnika opóźnienia KE i co się z tym wiąże na detekcję badanego kwasu elagowego. Za pomocą ww. faz ruchomych na płytkach RP18F₂₅₄ uzyskano wartości R_{fKE} w zakresie 0,72- 0,93, co umożliwiło łatwą identyfikację badanego związku. Równie korzystne okazały się do tego celu czyli detekcji KE płytki szklane pokryte żelem RP18WF₂₅₄ i RP8F₂₅₄. Zaletą użycia tych płytek było uzyskanie wartości współczynnika opóźnienia kwasu elagowego o nieco niższych wartościach niż uprzednio tj. w przedziale od 0,50 do 0,88 na płytkach RP18WF₂₅₄ i odpowiednio od 0,66 do 0,72 na płytkach pokrytych żelem RP8F₂₅₄. W związku z tym wymienione płytki mogą być z powodzeniem stosowane do szybkiej identyfikacji kwasu elagowego metodą TLC w świetle UV bez użycia odczynnika wywołującego. Następnie, w trakcie kolejnego etapu badań kwasu elagowego podjęto działania mające na celu wybór odczynnika wywołującego, który mógłby ułatwić również szybką jak powyżej identyfikację kwasu elagowego badanego metodą TLC. Dotychczasowe dane literaturowe wskazują na możliwość zastosowanie w tym celu 5% metanolowego roztworu chlorku żelaza (III) jako odczynnika wywołującego (Bagul et al. 2005). W obecnej pracy tak jak to zostało dokładnie opisane wcześniej przetestowano jako potencjalne odczynniki wywołujące kwas elagowy również roztwory błękitu brylantowo-krezolowego, błękitu tymolowego, zieleni brylantowej, cozyny żółtej, czerwieni fenolowej, czerwieni krezolowej, azotanu (V) miedzi (II), zieleni metylowej, zieleni

malachitowej i siarczaniu (VI) niklu (II). Obserwowane efekty po ich zastosowaniu, w tym barwa plamki KE i tła chromatogramu prezentuje Tab. 1. Analiza tych danych wskazują na przydatność jako nowych odczynników wywołujących kwas elagowy obok soli żelaza (III), z którym badany polifenol tworzy fioletowe plamki na żółtym tle pięciu innych nowo przebadanych odczynników wywołujących takich jak: zieleń brylantowa, zieleń malachitowa, azotan (V) miedzi (II), zieleń metylowa i siarczan (VI) niklu (II). Po zastosowaniu tych odczynników na chromatogramach KE, co prezentuje Tab. 2 uzyskuje się łatwe do identyfikacji bo dobrze widoczne w postaci żółtych plamek pasma KE na niebieskim lub jasnozielonym tle. W związku z tym odczynniki te mogą stanowić dobrą alternatywę dla opisanego w literaturze odczynnika wywołującego KE jakim jest chlorek żelaza (III).

W dalszym etapie badań nad kwasem elagowym przystąpiono do ilościowego oznaczania tego związku tj. określenie najmniejszej ilości jaką można wykryć i oznaczyć kwasu elagowy w zaproponowanych w niniejszej pracy warunkach chromatograficznych uznanych wcześniej za optymalne do jego wykrywania. Wartości LOD_{KE} i LOQ_{KE} wyznaczono w warunkach chromatograficznych w których skład wchodziły płytki pokryte żelazem krzemionkowym RP8F₂₅₄, RP18F₂₅₄ i RP18WF₂₅₄ oraz następujące fazy ruchome: metanol + woda (40 +10, v/v), propan-2-ol + woda (35+15, v/v), etanol + woda (35+15, v/v), acetonitryl + woda (42+8, v/v).

Analiza wyników LOD_{KE} i LOQ_{KE} uzyskanych przy zastosowaniu czterech różnych faz ruchomych: etanol-woda, propan-2-ol-woda, acetonitryl-woda oraz metanol-woda zestawionych w Tab. 2 wskazuje na największe podobieństwo pomiędzy wartościami zarówno LOD jak i LOQ badanego kwasu elagowego wyznaczonymi z wykorzystaniem płytek RP8F₂₅₄, RP18F₂₅₄ i RP18WF₂₅₄ rozwijanych za pomocą faz ruchomych złożonych z acetonitrylu i wody (42+8, v/v) oraz metanolu i wody (40+10, v/v). Szczegółowa interpretacja wyników LOD_{KE} zaprezentowanych w Tab. 2 pokazuje, że najniższą wartość $LOD_{KE}=0,072 \mu\text{g KE}$ na plamkę osiągnięto na płytkach RP18F₂₅₄ rozwijanych za pomocą mieszaniny: propan-2-ol+woda (35+15, v/v). Natomiast najłabsze rezultaty tzn. najwyższą wartość LOD_{KE} otrzymano za pomocą płytek RP8F₂₅₄ i fazy ruchomej metanol+woda, (40+10, v/v). Ponadto można zaobserwować, że faza ruchoma o składzie acetonitryl+woda (42+8, v/v) pozwala na detekcję kwasu elagowego na wszystkich trzech stosowanych płytkach na podobnym poziomie tj. około $0,5 \mu\text{g KE}$ na plamkę. W przypadku granicy oznaczalności badanego polifenolu wyrażonej w postaci LOQ_{KE} , co również prezentuje Tab. 2, można zaobserwować, że za pomocą zastosowanych jako optymalne warunków chromatograficznych można ilościowo oznaczyć badany związek w zakresie od $0,218$ do $1,899 \mu\text{g KE}$ na plamkę. Najlepsze warunki pozwalające oznaczyć kwas elagowy na najniższym poziomie to podobnie jak w przypadku wcześniej omówionych wartości LOD_{KE} płytki RP18F₂₅₄ i mieszanina propan-2-ol+woda (35+15, v/v) jako faza ruchoma. Porównanie wszystkich uzyskanych wyników granicy wykrywalności KE i granicy oznaczalności tego związku z wynikami otrzymanymi przez autora innej pracy tj. Bagul i współpracowników (Bagul et al. 2005), w której to oznaczano kwas elagowy obok kwasu galusowego za pomocą TLC w połączeniu z densytometrią z użyciem chlorku żelaza (III) jako odczynnika wywołującego, można stwierdzić, że otrzymane w obecnej pracy najniższe wartości LOD_{KE} i LOQ_{KE} są bardzo zbliżone do tych zaprezentowanych w badaniach autorstwa Bagul i współautorki, które to wynosiły: $LOD=0,050$ a $LOQ=0,160 \mu\text{g KE}$ na plamkę (Bagul et al. 2005). Wyniki te osiągnięto za pomocą czteroskładnikowej fazy ruchomej zawierającej w składzie: toluen+octan etylu+kwas mrówkowy+metanol (3:3:0,8:0,2, v/v/v/v). Z kolei zaproponowana w niniejszej pracy faza ruchoma pozwalająca wykryć i oznaczyć kwas elagowy na podobnym poziomie tj. $LOD_{KE}=0,072$ a $LOQ_{KE}=0,218 \mu\text{g KE}$ na plamkę jest mieszaniną prostszą w składzie tj. binarną i nie zawiera toluenu, co potwierdza fakt, że jest bardziej przyjazna i ekologiczna dla środowiska.

5. Wnioski

W wyniku licznie przeprowadzonych analiz chromatograficznych roztworu kwasu elagowego w metanolu stwierdzono:

- wpływ warunków chromatograficznych na wykrywanie i ilościowe oznaczanie kwasu elagowego metodą TLC

- wykazano przydatność pięciu nowych odczynników wywołujących, takich jak: zieleń brylantowa, zieleń malachitowa, azotan (V) miedzi (II), zieleń metylowa i siarczan (VI) niklu (II) do wykrywania badanego polifenolu
- stwierdzono, że najmniejszą ilość kwasu elagowego można wykryć i oznaczyć ilościowo za pomocą płytek RP18F₂₅₄ i fazy ruchomej złożonej z propan-2-olu i wody zmieszanych w stosunku objętościowym 35:15 (LOD_{KE}=0,072 µg KE na plamkę, LOQ_{KE}=0,218 µg KE na plamkę)
- zaproponowane w niniejszej pracy warunki identyfikacji i ilościowego oznaczania kwasu elagowego mogą być w przyszłości wykorzystane w kontroli jakości surowców lub preparatów zawierających badany polifenol.

6. Podziękowanie

Badania zostały sfinansowane przez Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, projekt nr PCN-1-045/N/1/F.

7. Literatura

- Agrawal OD, Kulkarni YA (2020) Mini-review of analytical methods used in quantification of ellagic acid. *Reviews in Analytical Chemistry* 39(1): 31-44, doi:10.1515/revac-2020-0113.
- Bagul M, Srinivasa H, Padh H, Rajani M (2005). A rapid densitometric method for simultaneous quantification of gallic acid and ellagic acid in herbal raw materials using HPTLC. *Journal of Separation Science* 28(6):581-584. doi: 10.1002/jssc.200301695.
- Bala I, Bhardwaj V, Hariharan S, Kumar MNVR (2006). Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 40(1): 206–210, doi:10.1016/j.jpba.2005.07.006.
- He X, Chen X, Ou X, Ma L, Xu W, Huang K (2019) Evaluation of flavonoid and polyphenol constituents in mulberry leaves using HPLC fingerprint analysis. *International Journal of Food Sciences*, doi:10.1111/ijfs.14281.
- Kalemba-Drożdż M, Grzywacz-Kisieleska A, Cierniak A, Łukasiewicz S, Kyzioł A, Dziedzicka-Wasylewska M, Kapler A (2022) Surowce polifenolowe. Zastosowania i perspektywy, Oficyna Wydawnicza KAAFM, Kraków, Polska, 11: 61.
- Kalinowska M, Borkowska M, Braun J, Lewandowski W (2020) Kwas elagowy jako naturalny polifenol o potencjalnym znaczeniu przemysłowym. *Przemysł Chemiczny* 99(1): 155-160.
- Majtkowski W, Balcerek M, Majtkowska G (2016) Porównanie zawartości związków fenolowych i aktywności antyoksydacyjnej u wybranych gatunków traw z kolekcji ogrodu botanicznego KCRZG w Bydgoszczy. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin (online)* 280: 79-86.
- Pieszko C, Zaremba A (2013) Zawartość związków fenolowych w ekstraktach z próbek materiału roślinnego. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna XLVI*, 4: 434-439.
- Pueyo IU, Calvo MI (2009) Assay conditions and validation of a new UV spectrophotometric method using microplates for the determination of polyphenol content. *Fitoterapia* 80(8): 465-467, doi:10.1016/j.fitote.2009.06.008.
- Sádecká J, Tóthová J (2012) Spectrofluorimetric determination of ellagic acid in brandy. *Food Chemistry* 135(3): 893-897, doi: [10.1016/j.foodchem.2012.06.019](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.019).
- Sharifi-Rad J, Quispe C, Castillo CMS et al. (2022) Ellagic acid: A review on its natural sources, chemical stability, and therapeutic potential. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. doi:10.1155/2022/3848084.
- Szmagara A, Krzyszczak A, Sadok I, Karczmarz K, Staniszevska MM, Stefaniak EA (2019) Determination of ellagic acid in rose matrix by spectrofluorimetry. *Journal of Food Composition Analysis* 78: 91-100, doi: 10.1016/j.jfca.2019.02.003.
- Zhu H, Yan Y, Jiang Y, Meng X (2022) Ellagic acid and its anti-aging effects on central nervous system. *International Journal of Molecular Sciences* 23(18). doi:10.3390/ijms231810937.

2. Zastosowanie metod fluorescencyjnych w badaniach biomedycznych

Fluorescence methods in biomedical applications

Imiołek Elwira^(1,2), Wiejak Marta^(1,2), Kempys Karolina^(1,2), Korzonek Kamila^(1,2), Piechaczek Karolina^(1,2), Sulik Agnieszka^(1,2), Słowiacek Karolina⁽²⁾, Janikowska Grażyna⁽³⁾

⁽¹⁾Młoda Farmacja Sosnowiec,

⁽²⁾Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Chemii Analitycznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

⁽³⁾Zakład Chemii Analitycznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec

Elwira Imiołek s79516@365.sum.edu.pl

Słowa kluczowe: intensywność fluorescencji, detekcja, obrazowanie

Streszczenie

Metody fluorescencyjne wykorzystuje się w wielu dziedzinach nauki, w diagnostyce laboratoryjnej, kontroli jakości leków, identyfikacji mikroorganizmów oraz produktów metabolicznych, a także w medycynie podczas zabiegów operacyjnych w formie obrazowania fluorescencyjnego. Ponadto, metody fluorescencyjne wykorzystuje się w detekcji materiału badawczego oraz próbek w różnych technikach analitycznych takich jak wysokosprawną chromatografię cieczową i spektroskopię. Widmo fluorescencyjne powstaje podczas naświetlania materiału lub próbki promieniowaniem o wyższej energii od emisji zwanym wzbudzeniem i otrzymaniem maksimum fali emisji przesuniętym w kierunku fal dłuższych (niższej energii). Technika tą można jakościowo i ilościowo oznaczyć wszystkie związki posiadające właściwości chromoforowe/luminochromowe (np. białka, RNA, DNA) lub inne nieorganiczne i organiczne w formie kompleksów z ligandami chromoforowymi (luminoforowymi). Technika ta jest bardzo czuła i dokładna, można nią oznaczyć związki chemiczne na poziomie nano i femto gramowym, jest nazywana techniką nanotechnologiczną. Od momentu jej powstania jest udoskonalana i wykorzystywana w analizach molekularnych, mikrobiologicznych, środowiskowych i toksykologicznych (sekwenatory, skanery, termocyklery do ilościowych reakcji z udziałem odwrotnej transkryptazy z detektorem fluorescencyjnym). Dzięki zastosowaniu coraz lepszych znaczników/biosensorów fluorescencyjnych oznacza się śladowe ilości różnych związków w tym toksyn, pojedynczych cząsteczek biomolekuł i wykrywa się guzy nowotworowe na wcześniejszym etapie choroby oraz stosuje się techniki obrazowania mikroskopowego wykorzystywane szeroko w medycynie.

1. Wprowadzenie

Metody fluorescencyjne są zwykle jednymi z pierwszych metod branych pod uwagę, gdy naukowcy lub praktycy są zainteresowani dużą dokładnością metody jakościowej i/lub ilościowej, obejrzeniem procesu biologicznego w działaniu lub chcą odkryć jego mechanizm. W prostych pomiarowych metodach spektroskopii fluorescencyjnej (spektrofluorymetrii, fluorymetrii) oraz detekcji fluorescencyjnej rejestrowane są zmiany intensywności (natężenia) fluorescencji (FI, ang. *Fluorescence Intensity*), a metody odczytu obrazu fluorescencyjnego oparte są przede wszystkim na zmianach czasu życia fluorescencji (FLT, ang. *Fluorescence Life Time*) (Szapoczka i in. 2023). W metodach fluorescencyjnych analizuje się fluorescencję próbki/materiału wywołaną zazwyczaj promieniowaniem ultrafioletowym, widzialnym, podczerwonym, promieniowaniem rentgenowskim lub światłem laserowym. Fluorescencja to przejście fotonów ze stanu wzbudzonego do stanu podstawowego. Źródłem promieniowania wzbudzającego próbkę lub materiał może być ksenonowa lampa łukowa, laser, systemy lamp metalohalogenowych sprzężonych z włóknami lub izotopowe źródło promieniowania rentgenowskiego, a detektorem fotopowielacz lub detektor wielokanałowy. W technice tej stosuje się między innymi monochromatory i fotopowielacze, fotodiody lawinowe

i moduły zliczania fotonów. Widma i sygnały rejestrują detektory i specjalistyczne komputery z odpowiednim oprogramowaniem. Można je zaobserwować w postaci wzrostu sygnału fluorescencji i/lub zmiany widma fluorescencji jako funkcji obecności sygnału wejściowego. Zależne to jest od stężenia fluoroforu (luminoforu), warunków oświetleniowych, wysokiej rozdzielczości i niskiego tła (ze względu na naturalne przesunięcie Stokesa między promieniowaniem źródła światła wzbudzenia a otrzymaną, i rejestrowaną długością fali emisji). W metodach ilościowych stosuje się zazwyczaj metodę krzywej wzorcowej stosując zależność intensywności fluorescencji od stężenia próbki. Klasyczne metody fluorescencyjne stosuje się powszechnie do analizy wielu związków organicznych, leków, środków spożywczych i substancji toksycznych występujących w niewielkich ilościach.

Obecnie na popularności zyskują metody fluorescencyjne oparte na diodach elektroluminescencyjnych (LED; znacznie niższa cena w stosunku do innych źródeł światła oraz długa trwałość) i systemach typu lab-on-a-chip (LOC; wysoka czułość, urządzenie nanotechnologiczne) z wbudowanym wzmacniaczem typu lock-in umożliwiającym pomiary w świetle otoczenia (Novak i in. 2007). Urządzenia te pozwalają zaoszczędzić czas oraz obniżyć poziom wykrywania nowych leków i patogenów, czy innych substancji biochemicznych. W medycynie zastosowanie znajdują również metody oparte na fluorescencji indukowanej laserem (LIF, ang. *Life Induced by Laser*), której przykładem może być analiza fotosensybilizatorów/fotouczulaczy metodą terapii fotodynamicznej (PDT, ang. *Photodynamic Therapy*), gdzie badany jest poziom i kinetyka gromadzenia się i wydalania sensybilizatorów w organizmie oraz optymalny czas ich ekspozycji po aplikacji związków fluoryzujących. Ponadto, stosuje się je w analizie endogennych fluoroforów, diagnostyce nowotworów (np. raka płuc), chorobach ginekologicznych, dermatologicznych, stomatologicznych i wykrywaniu zakażeń bakteryjnych oraz grzybiczych (Kwaśny i Bombalska 2022). Metody te charakteryzują się większą czułością i wykrywalnością zmian chorobowych w porównaniu z metodami tradycyjnej fluorescencji (w świetle odbitym).

2. Zastosowanie metod fluorescencyjnych opartych na pomiarze FI

Tysiące związków chemicznych w układach biologicznych oznaczanych jest za pomocą metod fluorescencyjnych. Wiele związków organicznych i również kationów pierwiastków przejściowych oznaczanych jest fluorescencyjnie w formie kompleksów z ligandami chromoforowymi, z dokładnością nanogramową (do $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$) i wyższą. Nanoklastry złota używane są do wykrywania metydationu - pestycydu fosforoorganicznego. Natomiast nanoklastry miedzi znajdują zastosowanie w identyfikacji i oznaczaniu ilościowym gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*) (Pawar i in. 2022; Huo i in. 2021).

Odczyty sygnałów fluorescencji w niektórych przypadkach, takich jak wczesna diagnostyka choroby lub oznaczenie śladowych ilości oznaczanych molekuł następczały problemów i były wręcz niemożliwe do zanalizowania za pomocą rutynowych tradycyjnych pomiarów. Coraz mniejsze ilości analitu można oznaczać dzięki znakowaniu *in vitro/in vivo* docelowych biomolekuł odpowiednimi znacznikami/czujnikami fluorescencyjnymi (np. lucyferyna i in., kropki kwantowe, białka fluorescencyjne). Powinny one charakteryzować się małą masą cząsteczkową, dobrą rozpuszczalnością w wodzie, brakiem solwatochromizmu, wąskim spektrum emisji, dużym przesunięciem Stokesa, fotostabilnością, wysokim współczynnikiem ekstynkcji i wysoką wydajnością kwantową. Takie cechy posiada białko fluorescencyjne GFP (ang. *Green Fluorescent Protein*), które świeci w czasie około dwóch godzin po jego syntezie zielonym światłem (widocznym gołym okiem) pochodzącym od ułożonych kolejno aminokwasów seryny-tyrozyny-glicyny – tworzących p-hydroksybenzylidenoimidazolinon, specyficzny chromofor. Ponadto, dzięki zastosowaniu znaczników fluorescencyjnych niefluoryzujący lub słabo fluoryzujący substrat przekształcany we fluoryzujący produkt można oznaczyć w śladowych ilościach. Znaczniki fluorescencyjne zmniejszają czas analizy i zużycie próbki. Poza tym określają ilość konkretnych cząstek za pomocą liczenia pojedynczych sygnałów fluorescencji. Dzięki nim można zliczać biomolekuły takie jak DNA, miRNA, enzymy, białka, nienaruszone komórki, które mogą służyć jako biomarkery konkretnej choroby. Ze względu na ich wysoką czułość, dobrą selektywność, szybkość i prostotę ich oznaczania biosensory fluorescencyjne znajdują szerokie zastosowanie w badaniach

biologicznych (metody oparte na oznaczaniu pojedynczych cząsteczek), diagnostyce klinicznej i oznaczeniach leków (Ma i in. 2016). Te znaczniki/czujniki fluorescencyjne mogą być również wykorzystane jako transportery leków przeciwnowotworowych w terapii celowanej i leczeniu typów nowotworów opornych na dotychczasowe leczenie wykorzystujących związki fotoczułe (Huo i in. 2021; Ma i in. 2016). Dzięki rozwojowi tych metod w laboratoriach rutynowo wykonuje się śladowe oznaczenia aminokwasów, tiaminy (witaminy B₁), ryboflawiny (witaminy B₂), kwasu foliowego, aktywności enzymów we krwi i innych płynach fizjologicznych. Metoda pomiarów sygnałów fluorescencji jest również wykorzystywana w ważnych badaniach losów leku w ustroju, biodystrybucji i farmakokinetyki leków zawierających wewnątrznie fluorofor/chromofor lub połączonych kompleksowo z zewnętrznym fluoroforem (Ma i in. 2016; Aktar i in. 2022). Pomiary FI zrewolucjonizowały naukę i medycynę, gdyż znalazły zastosowanie w urządzeniach, do oznaczenia kwasów nukleinowych, takich jak sekwenatory, skanery, termocyklery RT-PCR (ang. *Real Time Polymerase Chain Reaction*) z detektorem fluorescencyjnym. Dzięki zastosowaniu detekcji fluorescencyjnej jako pierwszą opracowano metodę wykrywania pojedynczej cząsteczki opartą na zasadzie reakcji łańcuchowej hybrydyzacji stosowaną do wykrywania czynnika martwicy nowotworu α (TNF- α , ang. *Tumour Necrosis Factor*) w próbce surowicy (Dai i in. 2014). Ponadto, opracowano wiele innych technik do półilościowych oznaczeń np. w genomice, transkryptomice, proteomice, lipidomice, polisacharydomice i metabolomice, oraz w oznaczeniach innych związków biologicznie czynnych, takich jak hormony, alkaloidy, a także do detekcji przeciwciał w oznaczeniach immunoenzymatycznych (Dai i in. 2014; Hwang 2018).

Generalnie biosensory można podzielić na nieseparacyjne i separacyjne. Biosensory nieseparacyjne są oparte na fluorescencyjnym rezonansowym przeniesieniu energii (FRET, ang. *Fluorescence Resonans Energy Transfer*) na technologii kropki kwantowej jako dawcy energii i służą do wykrywania różnych biomolekuł. Mają wysoką czułość i są stosowane w celu badania zmian w sekwencji DNA ściśle związanych z chorobą Alzheimera, anemią sierpowatą, czy nowotworami. Ponadto, wykorzystuje się je do rozróżniania mutacji punktowych genu K-ras u pacjentek z rakiem jajnika. Opracowano również biosensory wspomagane izotermiczną amplifikacją do ultraczułego wykrywania miRNA - niekodującego RNA odpowiedzialnego za regulację ekspresji genów. Opisane metody można wykorzystać w badaniu aktywności reninowej, kinazy białkowej zależnej od cAMP oraz telomerazy. Natomiast biosensory separacyjne opierają się na technikach separacji (np. separacji magnetycznej i chromatografii powinowactwa), aby wyeliminować sygnał tła. Są one odpowiednie do wykrywania modyfikacji potranslacyjnych, a konkretnie przyłączenia łańcuchów modyfikujących ubikwitynopodobnych do białek. Ubikwitynacja jest odpowiedzialna za regulację procesów komórkowych. Wykazano, że jest ona związana z cukrzycą typu 1 czy chorobą Parkinsona (Huo i in. 2021; Ma i in. 2016; Aktar i in. 2022). Biosensory pozwalają również wykryć geny HIV-1 i HIV-2. Możliwe jest także wykrywanie enzymów modyfikujących histony przy użyciu acetylotransferazy histonowej i metylotransferazy histonowej, które mogą specyficznie modyfikować znakowane białka w pozycjach H3K14 oraz H3K9. Biosensory separacyjne są także używane do wykrywania komórek raka płuca na poziomie pojedynczej cząsteczki przy użyciu aptamerów (krótkie fragmenty DNA lub RNA, lub polipeptydów) znakowanych barwnikiem fluorescencyjnym. Ten biosensor rozróżnia, na przykład, dwie ludzkie komórki gruczolakoraka płuc – komórki A549 oraz H23 (Hwang 2018; Torres i in. 2020).

Biosensory fluorescencyjne na bazie grafenu są bardzo czułe i nieinwazyjne. Nanomateriał DNA przyczepiony do powierzchni tlenku grafenu użyto do wykrywania guzów wątroby. System ten ma wysoką zdolność do celowania w komórki raka wątroby (Pawar i in. 2022). Ponadto, badania wskazują, że mutacje DNA można wykryć za pomocą znakowanych fluorescencyjnie sond oligonukleotydowych z tylko jednym fluoroforem (Hwang 2018). Biosensory fluorescencyjne są również stosowane w analizie bezpieczeństwa żywności.

3. Metody fluorescencyjne w oznaczaniu śladowych ilości toksyn

Nanotechnologiczne metody fluorescencyjne znalazły zastosowanie również do oznaczania śladowych ilości toksyn w wodzie, paszach, żywności (powszechnie występują w kawie, winie i suszonych winogronach) i wielu innych. Zanieczyszczenia toksynami, zwłaszcza grzybowymi,

nawet najmniejszymi ilościami są niebezpieczne dla zdrowia i życia ludzi i zwierząt. Do ich oznaczania stosuje się najczęściej metody fluorescencyjne o wysokiej czułości i selektywności wykorzystujące również biosensory (Aktar i in. 2022).

Aby zminimalizować ryzyko wpływu toksycznego metabolitu wtórnego grzybów - ochratoksyny A (OTA) na organizm człowieka, podczas jej oznaczania ilościowego w żywności zanieczyszczonej/porośniętej grzybami *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius* oraz *Penicillium verrucosum*, opracowano metodę fluorescencyjną opartą na aptamerach. Metoda ta wykorzystuje egzoukłeazę RecJf wzmacniającą sygnał na tlenku grafenu (Zhao i in. 2020). Badania OTA można również opierać na tworzeniu fluorescencyjnego kompleksu na powierzchni falowodu. Testy te jest w stanie wykryć w mące kukurydzianej nawet bardzo niskie stężenia OTA rzędu 0,1 ng/mL. Ponadto, dostępny jest również multipleksowy test oparty na fluorescencji do jednoczesnego wykrywania OTA i deoksynivalenolu, lub OTA i aflatoksyny. Natomiast kompetycyjny test immunologiczny z polaryzacją fluorescencji w oparciu o przeciwciała monoklonalne i znacznik fluorescencyjny pozwala na oznaczenie OTA w czerwonym winie (Malhotra i in. 2014).

Aflatoksyny to grupa wtórnych metabolitów grzybów wytwarzanych przez *Aspergillus Flavus* i *Aspergillus Parasiticus* wywołujących skażenia żywności. Jedną z oficjalnych metod monitorowania obecności aflatoksyn jest chromatografia cienkowarstwowa oraz wysokosprawną chromatografię cieczową z detektorem fluorescencyjnym lub masowym (Sharma i in. 2018).

Powierzchniowy rezonans plazmonowy lub wzmocniona spektroskopia plazmonowa służy do wykrywania aflatoksyny M1 w mleku. Natomiast, wiązanie cząsteczek oznakowanych fluoroforem lub analitu z powierzchnią sensora bada się za pomocą plazmonów (kwazicząstek, wynikających z kwantowania oscylacji plazmy) powierzchniowych pozwalających wykryć emitowane światło fluorescencyjne (Malhotra i in. 2014). Opracowano również amperometryczne oznaczenie aflatoksyny B1 (toksyna orzeszków ziemnych doprowadzająca do uszkodzenia wątroby), który wykorzystuje oksydazę aflatoksyny jako biosensor (Sharma 2018).

Toksyna cholery (CTX) złożona z dwóch podjednostek jest białkiem wydzielanym przez szczep *Vibrio cholerae*. Podjednostka A (CTX-A) odpowiada za działanie toksyczne, natomiast podjednostka B (CTX-B) jest nietoksyczna i odpowiada za specyficzne wiązanie z miejscem docelowym. Do ich oznaczania w wodzie pitnej stosuje się powierzchniową fluorescencyjną spektroskopię plazmonową wzmocnioną polem stosując jako biosensor podjednostkę CTX-B (Seherler i in. 2022).

4. Obrazowanie fluorescencyjne

W obrazowaniu obiektów żywych ma zastosowanie biofotonika, opisująca oddziaływanie światła (fotonów) z materią na różnych jej poziomach. To właśnie dzięki niej powstało obrazowanie fluorescencyjne wykorzystujące promieniowanie niejonizujące, bezpieczne dla większości żywych tkanek biologicznych. Może ona dostarczać obrazów o niezwykle wysokiej rozdzielczości, ukazujących procesy nawet na poziomie subkomórkowym zapewniając bardzo niskie obrazy tła, które gwarantuje przesunięcie Stokesa między źródłem światła wzbudzenia a długościami fal emisji. Ponadto, stosując związki fluorescencyjne bliskiej podczerwieni (NIR) można zniwelować wadę jej słabej penetracji do grubszej tkanki. W obrazowaniu fluorescencyjnym wykryty sygnał mierzy ilość fotonów, które są w stanie dotrzeć do detektora. W tej metodzie schematami określania FI są techniki mierzenia intensywności fluorescencji, widm i obecność lub brak sygnałów przenoszenia energii rezonansu Förstera (FRET) (Torres i in. 2020). Rezonansowy transfer energii fluorescencji jest szeroko stosowanym narzędziem do badania wielu interakcji molekularnych (Huo i in. 2021). Ponadto używany jest system, w którym fluorofor jest wygaszany lub metoda określająca, czy FI jest większe niż określony punkt odcięcia. Ocenia się również zmiany widma fluorescencji, obserwując, czy można zobaczyć jeden lub dwa piki (zanieczyszczenia, interakcje, mutacje).

Mikroskopia obrazowa (FLIM, ang. *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*) jest potężnym narzędziem diagnostycznym opartym na zmianach czasu życia fluorescencji (FLT), gdzie FLT fluoroforu jest statystyczną miarą czasu, przez jaki elektrony cząsteczki pozostają w stanie wzbudzonym. Jest to nieodłączną cechą fluoroforu i nie zależy od stężenia fluoroforu ani warunków oświetleniowych, tak jak to jest w przypadku FI. Przykładami zastosowania FLIM do wykrywania

biologicznie istotnych sytuacji to użycie diocetanu fluoresceiny do wykrywania pH roztworu (Pawar i in. 2022), rotory molekularne Bodipy do wykrywania lepkości (Shimolina i in. 2017) lub cząsteczki wiążące jony do wykrywania wewnątrzkomórkowej rtęci (Pawar i in. 2022).

W nowoczesnych laboratoriach szeroko stosuje się mikroskopy fluorescencyjne np. do wizualizacji obiektów biologicznych i monitorowania fizjologii komórki. Stosuje się w nich barwniki używane do sprawdzania żywotności komórek pozwalające na procentowe określenie ilości komórek żywych i martwych (barwienie jodkiem propidyny, oranżem akrydyny lub in.). W oznaczaniu ilościowym DNA (przyłączenie się w małym rowku helisy DNA) stosowana jest grupa barwników fluorescencyjnych zwanych Hoechst (z języka niemieckiego – barwnik, grupa barwników bis-benzimidazolowych, najczęściej używane maksimum promieniowania wzbudającego 350 nm, emisja od 360 - 600 nm), których natężenie emisji niebiesko-fioletowego promieniowania jest wprost proporcjonalne do ilości DNA (spełnia prawo Lamberta-Beera). Barwniki Hoechst są także używane jako zamiennik barwnika DAPI (4',6-diamidyno-2-fenylindol, barwnik fluorescencyjny wzbudzany światłem UV, wiążący się z DNA maksimum emisji 461 nm i RNA 400 nm) w mikroskopii fluorescencyjnej do barwienia jąder komórkowych, mitochondriów i chromosomów. Akworyna (enzym katalizujący utlenianie w obecności wapnia, gdzie następuje uwolnienie dwutlenku węgla i emisja promieniowania o długości fali 466 nm) oraz białko GFP są stosowane do wizualizacji komórek nerwowych mózgu i obserwacji ich aktywności. Przykładem substancji fotobioaktywnej o właściwościach fluorescencyjnych wykorzystywanej w tym zakresie badań jest CaMPARI - fotoaktywne białko, znacznik fluorescencyjny zależny od wapnia - mający zastosowanie w neurologicznych badaniach behawioralnych i funkcjonalnych *in vivo*, etykietujący aktywne neurony. Przyżyciowe znacznikowanie fluorescencyjne i mikroskopowe techniki superrozdzielcze pozwalają na obserwacje wewnątrzkomórkowych procesów molekularnych, struktur i białek. Jednakże etykietowanie fluorescencyjne ulega procesom fotowysparzenia, a samo znacznikowanie komórek może wpływać na ich fenotyp i metabolizm, tak więc swoje znaczenie również mają techniki bezznacznikowe. W układach optycznych wykorzystuje się w tym celu między innymi plazmoneczne czujniki nanostrukturalne ze spektroskopią Ramana, co pozwala uzyskać mniejszą toksyczność i ułatwia to wyraźną klasyfikację komórek (żywe, martwe, apoptotyczne, zdrowe, rakowe) (Romaniuk 2023). Innym zastosowaniem medycznym obrazowania fluorescencyjnego może być obrazowanie nowotworów, chorób immunologicznych czy cukrzycy. Do tych specjalistycznych badań wykorzystuje się również biosensory, aby wzmocnić sygnał przy ocenie molekuł takich jak białka, lipidy lub jony (Huo i in. 2021). Koncepcje wzbudzenia i emisji fluorescencji mają zastosowanie również w laserowej skaningowej mikroskopii konfokalnej, mikroskopii dwufotonowej (impulsowe wzbudzenie fluorescencji laserem o dużej długości fali), dyskowej mikroskopii konfokalnej (mikroskop ten rejestruje natężenie światła za pomocą kamery), całkowitego wewnętrznego odbicia (technika obrazowania bliskiego pola, oferująca znacznie lepsze przekroje optyczne) i mikroskopii super-rozdzielczej (oddzielanie fluorescencji od poszczególnych cząsteczek fluoroforu przez czasowe oddzielanie czasów ich emisji, rozdzielczość poprzeczna około 20 nm i osiowa 50 nm) (Sanderson i in. 2014). Sygnały fluorescencji obserwowane za pomocą mikroskopii konfokalnej (o zwiększonym kontraście) lub obrazowania pojedynczych cząsteczek oparte są na fluorescencji całkowitego wewnętrznego odbicia (Kwaśny i Bombalska 2022; Torres i in. 2020). Wszystkie wymienione powyżej metody fluorescencyjne przyczyniły się do olbrzymiego postępu w medycynie i badaniach biomedycznych.

5. Fotodynamiczne techniki oparte na fluorescencji

Jedną z technik opartych na zjawisku fluorescencji jest również terapia fotodynamiczna. Metoda ta polega na wzbudzeniu podanego barwnika przez promieniowanie w zakresie widzialnym i wytworzeniu długotrwałego stanu trypletowego, który może wchodzić w interakcje z tlenem cząsteczkowym, wytwarzając przy tym reaktywne formy tlenu, które uszkadzają biomolekuły i zabijają chore komórki. W procesie tym do obrazowania pola terapii wykorzystuje się również specyficzne i czułe sondy fluorescencyjne (Ericson i in. 2003; Sharma i Hamblin 2021). Technikę fotodynamicznego obrazowania światłem fluorescencyjnym stosuje się również w celu diagnostyki cystoskopowej pęcherza moczowego, endoskopowej jelita grubego, przełyku i innych narządów

wewnętrznych, a także skóry oraz nowotworów szyjki macicy z miejscowym zastosowaniem kwasu 5 – aminolewulinowego (jako sondy fluorescencyjnej) naświetlając tkankę światłem niebieskim (405 nm) w celu rozpoznania zmian dysplastycznych i raka. Precyzja tej metody fotodynamicznej zwiększa się wraz z zaawansowaniem patologicznych zmian (Ericson i in. 2003; Sieroń i in. 2013) i podobnie jest w wielu innych metodach wykorzystujących tę technikę.

6. Podsumowanie

Największy postęp w wielu badaniach biomedycznych spowodowało zastosowanie w nich metod fluorescencyjnych a w szczególności detektorów fluorescencyjnych, które to pozwalają na identyfikację śladowych ilości zanieczyszczeń w badaniach środowiskowych, toksyn w badaniach toksykologicznych, mikroorganizmów w badaniach wirusologicznych lub bakteriologicznych oraz materiału genetycznego w kryminalistyce. Rozwój metod fluorescencyjnych przyczynił się również do powstania nowych metod diagnostycznych i ulepszenia obrazowania materiału biologicznego z wykorzystaniem znaczników/biosensorów. Wszystkie wymienione zastosowania metod fluorescencyjnych od lat osiemdziesiątych ubiegłego wieku przyczyniły się do dużego postępu w naukach biomedycznych.

7. Literatura

- Aktar A, Wodz KM, Heit B (2022) Monitoring cellular responses to infection with fluorescent biosensors. *Methods in Molecular Biology* 2440: 99-114.
- Dai S, Feng C, Li W, et al. (2014) Quantitative detection of tumor necrosis factor- α by single molecule counting based on a hybridization chain reaction. *Biosensors Bioelectronics* 60:180-184.
- Ericson MB, Sandberg C, Gudmundson F, et al. (2003) Fluorescence contrast and threshold limit: implications for photodynamic diagnosis of basal cell carcinoma. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 69 (2): 121-127.
- Hu X, Li G, Wu S (2022) Advances in Diagnosis and Therapy for Bladder Cancer. *Cancers (Basel)* 14(13): 3181.
- Huo YP, Liu S, Gao ZX, et al. (2021) State-of-the-art progress of switch fluorescence biosensors based on metal-organic frameworks and nucleic acids. *Mikrochimica Acta* 188(5):168.
- Hwang GT (2018) Single-labeled oligonucleotides showing fluorescence changes upon hybridization with target nucleic acids. *Molecules* 23(1): 124.
- Kwaśny M, Bombalska A (2022) Applications of Laser-Induced Fluorescence in Medicine. *Sensors (Basel)* 22(8): 2956.
- Ma F, Li Y, Tang B, i in. (2016) Fluorescent biosensors based on single-molecule counting. *Accounts of Chemical Research* 49(9):1722-1730.
- Malhotra BD, Srivastava S, Ali MA, et al. (2014) Nanomaterial-based biosensors for food toxin detection. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 174(3): 880-896.
- Namikawa T, Fujisawa K, Munekage E, et al. (2018) Clinical application of photodynamic medicine technology using light-emitting fluorescence imaging based on a specialized luminous source. *Medical Molecular Morphology* 51(4): 187-193.
- Novak L, Neuzil P, Pipper J, et al. (2007) An integrated fluorescence detection system for lab-on-a-chip applications. *Lab on a Chip* 7(1): 27-29.
- Pawar S, Duadi H, Fleger Y, et al. (2022) Design and use of a gold nanoparticle-carbon dot hybrid for a FLIM-based implication nano logic gate. *ACS Omega* 7(26): 22818-22824.
- Romaniuk R (2023). *Biofotonika klasyczna i kwantowa. cz. 2, Materiały, biosubstancje, obiekty. Elektronika – konstrukcje, technologie, zastosowania* 64(4): 13-27.
- Sanderson MJ, Smith I, Parker I, et al. (2014) Fluorescence microscopy. *Cold Spring Harbor Protocol* 2014(10): pdb.top071795.
- Seherler S, Bozdogan A, Ozal Ildeniz TA, et al. (2022) Detection of cholera toxin with surface plasmon field-enhanced fluorescent spectroscopy. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 69(4): 1557-1566.

- Sharma A, Khan R, Catanante G, et al. (2018) Designed strategies for fluorescence-based biosensors for the detection of mycotoxins. *Toxins (Basel)*. 10(5): 197.
- Sharma SK, Hamblin MR (2021) The Use of fluorescent probes to detect ROS in photodynamic therapy. *Methods in Molecular Biology* 2202: 215-229.
- Shimolina LE, Izquierdo MA, López-Duarte I, et al. (2017) Imaging tumor microscopic viscosity in vivo using molecular rotors. *Scientific Reports* 7: 41097.
- Sieroń A, Sieroń-Stołtny K, Kawczyk-Krupka A, et al. (2013) The role of fluorescence diagnosis in clinical practice. *Onco Targets Therapy* 6: 977-982.
- Szapoczka WK, Truskewycz AL, Skodvin T, et al. (2023) Fluorescence intensity and fluorescence lifetime measurements of various carbon dots as a function of pH. *Scientific Reports* 13(1): 10660.
- Torres Vidal A, Medintz IL, Bui H (2020) DNA microsystems for biodiagnosis. *micromachines (Basel)* 11(4): 445.
- Zhao H, Xiong D, Yan Y, Ma C (2020) Amplified fluorescent aptasensor for ochratoxin A assay based on graphene oxide and RecJf exonuclease. *Toxins (Basel)* 12(11): 670.

3. Spektroskopowa analiza oddziaływania związku o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym z głównym białkiem transportującym surowicy – badania wstępne

Spectroscopic analysis of the interaction between compound with potential anticancer activity with main serum carrier protein

Piordas Katarzyna ⁽¹⁾, Piśla Patrycja ⁽¹⁾, Owczarzy Aleksandra ⁽²⁾, Maciążek-Jurczyk Małgorzata ⁽²⁾

⁽¹⁾ Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Farmacji Fizycznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

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

Owczarzy Aleksandra: aowczarzy@sum.edu.pl

Słowa kluczowe: albumina surowicy, spektrofluorymetria, spektroskopia UV-Vis

Streszczenie

Substancja lecznicza wprowadzona do organizmu może wywołać efekt farmakologiczny jedynie w postaci wolnej, niezwiązanej z białkowym nośnikiem. Dawkę terapeutyczną oraz toksyczną można określić poprzez między innymi analizę oddziaływań badanej substancji z głównymi białkami transportującymi krwi. Albumina surowicy ludzkiej (ang. *Human Serum Albumin*, HSA) jest najważniejszym białkiem surowicy i spełnia wiele istotnych funkcji, między innymi odpowiada za transport związków egzo- i endogennych do miejsca docelowego w ustroju.

9-hydroksy-5-metylo-12(H)-chino[3,4-b][1,4]benzotiazyna (Salt4) to substancja o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym. Salt4 wykazuje działanie antyproliferacyjne w stosunku do linii komórkowych raka jelita grubego (HCT116) oraz raka płuc Lewisa (LLC) w odniesieniu do doksorubicyny.

Celem przeprowadzanych badań była wstępna, pilotażowa, spektroskopowa analiza oddziaływań 9-hydroksy-5-metylo-12(H)-chino[3,4-b][1,4]benzotiazyny (Salt4) z albuminą surowicy ludzkiej (HSA).

1. Wstęp

Albumina (ang. *Human Serum Albumin*, HSA) jest głównym białkiem surowicy krwi. Stanowi około 60% białka całkowitego we krwi i pełni wiele istotnych funkcji w organizmie człowieka (Bteich 2019). Syntezowana jest głównie przez komórki wątroby (hepatocyty). Prawidłowe stężenie HSA wynosi od 35 do 50 g/L i jest regulowane za pomocą mechanizmu sprzężenia zwrotnego ujemnego (Weaving G i in. 2016). Synteza albuminy stymulowana jest przez hormony, takie jak insulina, kortyzol i hormon wzrostu, natomiast hamują ją substancje prozapalne, w tym interleukina-6 (IL-6) i czynnik martwicy nowotworów alfa (TNF α). Czas połowicznego zaniku albuminy wynosi około 19 dni, a rozpad białka zachodzi głównie w przewodzie pokarmowym, nerkach i wątrobie (Traczyk 1992). Dominującą funkcją HSA jest zdolność wiązania wody, dlatego też odpowiada ona za utrzymanie prawidłowego ciśnienia onkotycznego i objętości osocza. Dodatkowo, dzięki zdolności wiązania cząsteczek zarówno o charakterze kwasowym, jak i zasadowym, białko to umożliwia utrzymanie stabilnego pH osocza. Spełnia także rolę nośnikową, odpowiada za transport wielu substancji pochodzenia egzo- i endogennego, takich jak: kwasy tłuszczowe, hormony, witaminy, barwniki żółciowe oraz niektóre leki (Moman i in. 2022).

Cząsteczka albuminy ludzkiej zbudowana jest z pojedynczego łańcucha polipeptydowego złożonego z 585 aminokwasów o masie cząsteczkowej około 66439 Da. Kształtem przypomina serce o wymiarach 80×80×30 Å. Struktura drugorzędowa HSA zdominowana jest przez strukturę α -helisy, która stanowi około 67%. Albumina w swojej budowie nie posiada elementu β -harmonijki. Każda cząsteczka HSA składa się z trzech homologicznych domen, odpowiednio I, II i III, które podobne są

do siebie pod względem sekwencji aminokwasów oraz struktury drugo- i trzeciorzędowej (Fanali i in. 2012). Pojedynczą domenę tworzy 10 helis, od h1 do h10. Każda domena podzielona jest na dwie subdomeny A i B, które zbudowane są odpowiednio przez sześć i cztery α – helisy, połączone elastycznymi pętlami. Wieloletnie badania nad zdolnością wiązania leków z albuminą surowicy ludzkiej wykazały, że posiada ona wiele miejsc wiązania o różnym powinowactwie do ligandów. Najobszerniej zbadane i opisane zostały dwa miejsca wiązania, nazywane jako I i II miejsce Sudlowa (Sudlow i in. 1976).

I miejsce Sudlowa charakteryzuje obecność pojedynczej reszty Trp w pozycji 214 (Trp-214) i dodatkowo naładowana reszta lizynowa (Lys). To miejsce wiązania jest głównie apolarnie, zawiera jednak dwa skupiska reszt polarnych: wewnętrzną grupę za dnem kieszeni, którą stanowi Tyr-150, His-242, Arg-257 i zewnętrzny obszar, który zlokalizowany jest przy wejściu do kieszeni wiążącej, złożony z następujących reszt aminokwasowych: Lys-195, Lys-199, Arg-218 i Arg-222. Subdomena IIA ograniczona jest resztami Trp-214, Leu-219, Phe-223, Leu-238, His-242, Leu-260, Ile-264, Ser-287, Ile-290 i Ala-291. Dodatkowo w toku licznych badań subdomena IIA została podzielona na trzy regiony: Ia, Ib i Ic. Region Ia częściowo pokrywa się z regionem Ib i regionem Ic i pełni między nimi rolę pomostową (Yamasaki K i in. 1996).

II miejsce Sudlowa odpowiadające subdomenie IIIA jest mniejsze i ma postać wydłużonej hydrofobowej kieszeni posiadającej odrębny obszar polarny zlokalizowany blisko wejścia do kieszeni wiążącej leki, gdzie znajdują się reszta arginylowa (Arg-410) i reszta tyrozylowa (Tyr-411) (Ghuman i in. 2005).

Spektroskopia fluorescencyjna jest przydatną techniką w analizie strukturalnej biomolekuł. Ze względu na wysoką rozdzielczość przestrzenną i czasową znalazła zastosowanie w naukach biologicznych i biomedycznych. Możliwość wykorzystania spektrofluorymetrii do analizy interakcji pomiędzy ligandem a białkiem zależy od właściwości badanych związków (liganda i białka): fotostabilności, wydajności kwantowej, przesunięcia Stokesa i czasu życia fluorescencji (Zhang i in. 2012). Spektroskopia fluorescencyjna jest istotnym narzędziem do badania interakcji endo- i egzogennej substancji z białkami, ponieważ umożliwia pomiary w bardzo niskich stężeniach w warunkach fizjologicznych (Zhang i in. 2012 i Mocanu i in. 2018).

Drugą pomocną techniką a zarazem uzupełniającą pomiary spektrofluorescencyjne jest spektroskopia absorpcyjna UV-VIS. Technika ta wykorzystuje zakres promieniowania elektromagnetycznego od 200 nm do 780 nm. Jest to prosta i łatwo dostępna technika stosowana w kontroli jakości i rutynowych analizach głównie w przemyśle farmaceutycznym. Charakteryzuje się dużą szybkością i wiarygodnością wyników, z prostą i łatwą w użyciu interpretacją (Ferreira i in. 2020).

2. Materiały i metody

2.1 Materiały

Albumina surowicy krwi (HSA) – frakcja V (MP Biomedicals), chlorek 9-hydroksy-5-metylo-12(H)-chino[3,4-b][1,4]benzotiazyny (Salt4) (Katedra i Zakład Chemii Organicznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach), metanol do spektroskopii (Supelco), bufor fosforanowy pH 7.4.

2.2 Metody

Zmiany intensywności emisyjnych widm fluorescencyjnych badanych układów, w obecności liganda o wzrastającym stężeniu zarejestrowano przy użyciu spektrofluorymetru JASCO FP 6500. Próbkę skanowano z szybkością 50 nm/s, średnim wzmocnieniem sygnału i czasem odpowiedzi 2 sekundy. Szerokość szczeliny wzbudzenia wynosiła 3 nm, a emisji 5 nm. Błąd aparatu mieści się w granicach ± 1.5 nm.

Fluorescencyjne widma emisyjne układów: Salt4-HSA otrzymano przy użyciu długości fali wzbudzenia λ_{ex} 275 nm i 295 nm. Od otrzymanych emisyjnych widm fluorescencyjnych odejmowano widmo rozproszenia spowodowane obecnością buforu. Równocześnie, dla każdego badanego układu rejestrowano widma absorpcyjne z wykorzystaniem spektrofotometru UV-VIS Jasco V-530, w celu uwzględnienia efektu wewnętrznego filtra (IFE, ang. *Inner Filter Effect*).

2.3 Przygotowanie próbek

Roztwór albuminy surowicy ludzkiej (HSA) o stężeniu $3 \cdot 10^{-6}$ mol \cdot dm $^{-3}$ przygotowano poprzez rozpuszczenie odpowiedniej ilości naważki liofilizowanego białka w buforze fosforanowym o pH 7.4. Przygotowano również roztwór zapasowy Salt4 o stężeniu $3 \cdot 10^{-3}$ mol \cdot dm $^{-3}$ w metanolu.

W celu oceny oddziaływań pomiędzy ligandem a białkiem, roztwór HSA miareczkowano roztworem zapasowym Salt4 aż do osiągnięcia stosunku molowego Salt4:HSA = 8:1.

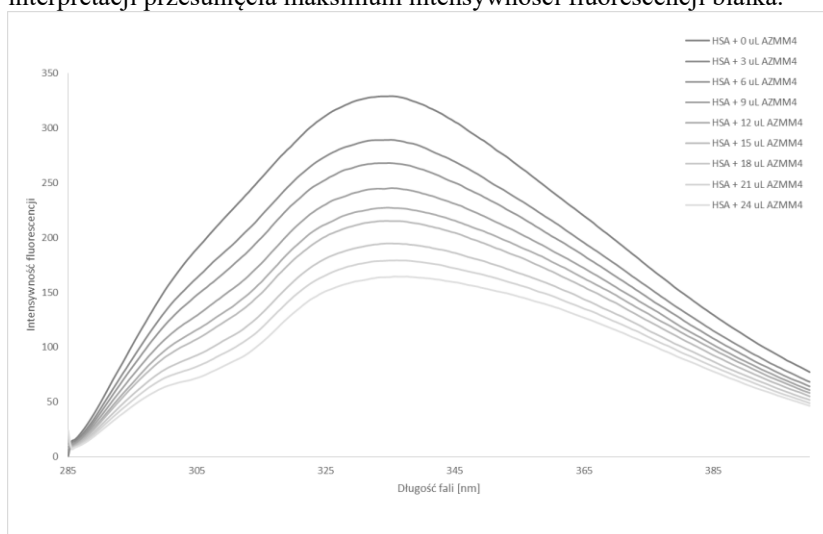
3. Wyniki i dyskusja

Analiza oddziaływań występujących pomiędzy ligandem, a modelowym białkiem transportującym surowicy, którym jest HSA. Stanowi to wstęp do badań przedklinicznych i klinicznych. Zmiany intensywności emisyjnych widm fluorescencyjnych badanego białka w obecności liganda o wzrastającym stężeniu pozwalają scharakteryzować oddziaływania międzycząsteczkowe. Warunkiem jaki musi zostać spełniony, aby doszło do wygaszenia fluorescencji białka, jest odpowiednia odległość pomiędzy chromoforem (badanym lekiem), a wzbudzonym fluoroforem (białkiem). Reszty tyrozylowe oraz pojedyncza reszta tryptofanowa (Trp-214) obecne w cząsteczce HSA ogrywają kluczową rolę w analizie interakcji pomiędzy ligandem, a białkiem z wykorzystaniem technik spektroskopowych.

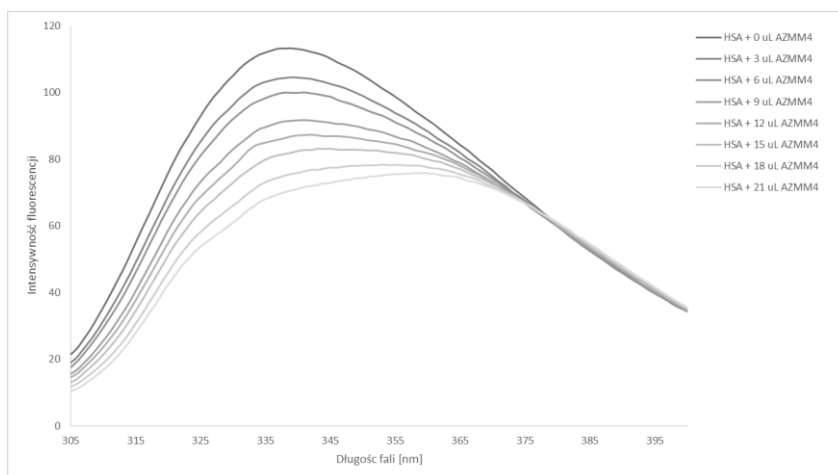
Zarejestrowano emisyjne widma fluorescencji albuminy surowicy ludzkiej (HSA) o stężeniu $3 \cdot 10^{-6}$ mol \cdot dm $^{-3}$ w obecności Salt4 o wzrastającym stężeniu, przy długości fali wzbudzenia λ_{ex} 275 nm i 295 nm (Rys. 1, Rys 2).

Na podstawie emisyjnych widm fluorescencyjnych HSA o stężeniu $3 \cdot 10^{-6}$ mol \cdot dm $^{-3}$ w obecności Salt4, którego stężenie wzrastało od $3 \cdot 10^{-6}$ mol \cdot dm $^{-3}$ do $2.4 \cdot 10^{-5}$ mol \cdot dm $^{-3}$ zarówno dla długości fali wzbudzenia λ_{ex} 275 nm, jak i 295 nm zaobserwowano zmniejszenie intensywności fluorescencji HSA wraz ze wzrostem stężenia nowo zsyntetyzowanej substancji o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym (Rys. 1, Rys. 2). Zaobserwowano również przesunięcie w kierunku fal długich maksimum intensywności fluorescencji HSA w obecności Salt4 o stężeniu $2.4 \cdot 10^{-5}$ mol \cdot dm $^{-3}$ w stosunku do widma HSA. Dla długości fali wzbudzenia λ_{ex} 275 nm wynosiło $\Delta\lambda_{\text{max}} = 3$ nm, a dla 295 nm, $\Delta\lambda_{\text{max}} = 21$ nm. Zjawisko wygaszania fluorescencji białek spowodowane obecnością liganda związane jest z bezpośrednim przekazaniem energii pomiędzy donorem (białkiem) a akceptorem (ligandem) znajdującym się w odległości nie większej niż 10 nm (Valeur 2009). Spadek intensywności fluorescencji z jednoczesnym przesunięciem jej maksimum w kierunku fal krótszych zostały zaobserwowane przez Maciążek-Jurczyk i in. podczas analizy wpływu agregacji/fibrylacji na makromolekułę HSA. Dodatkowo autorzy pracy badali właściwości fizykochemicznych utworzonych fibryli amyloidowych przy użyciu tioflawiny T (ThT) oraz analizowali zdolność wiązania liganda do zagregowanej/fibrylizowanej albuminy w obecności markerów miejsca wiązania takich jak: danylo-l-glutamina (Glu), danylo-l-prolina (dPro), fenylobutazonu (Phb) i ketoprofen (Ket). Podczas analizy emisyjnych widm fluorescencyjnych zaobserwowano przesunięcie maksimum intensywności fluorescencji w kierunku fal krótszych (ang. *blue shift*). W celu potwierdzenia zjawiska, wykorzystano spektralny parametr A. Na podstawie analizy danych liczbowych udowodniono, że spektralny parametr A jest użytecznym narzędziem do oceny zmian mikrośrodowiska aminokwasów aromatycznych, a spadek jego wartości potwierdza wzrost hydrofobowości otoczenia wokół aminokwasów (Maciążek-Jurczyk M i in. 2020). Salt4 przeciwnie jak w badaniach przeprowadzonych przez Maciążek-Jurczyk i in. powoduje przesunięcie maksimum intensywności fluorescencji w kierunku fal długich. Na tej podstawie możemy przypuszczać, że Salt4 powoduje zmianę środowiska wokół aminokwasów aromatycznych obecnych w cząsteczce białka na bardziej hydrofilowe. Badania wstępne pokazały, że następuje bardzo silne przesunięcie maksimum intensywności fluorescencji w kierunku fal długich dla długości fali wzbudzenia λ_{ex} 295 nm ($\Delta\lambda_{\text{max}} = 21$ nm), dlatego w celu potwierdzenia lub wykluczenia zmian mikrośrodowiska aminokwasów aromatycznych badania należałoby poszerzyć badania o obliczenie spektralnego parametru A oraz wskazanie zmian szerokości widma w połowie wysokości (ang. *Full Width at Half Maximum*, FWHM) (Owczarzy i in 2021). Dodatkowo należałoby również ocenić, czy

Salt4 wykazuje zdolność do fluorescencji w zakresie emisji białka, co również mogłoby przyczynić się do błędów w interpretacji przesunięcia maksimum intensywności fluorescencji białka.



Rys. 1. Emisyjne widma fluorescencyjne HSA o stężeniu $3 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ w obecności Salt4 o wzrastającym stężeniu ($3 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \div 2.4 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), przy długości fali wzbudzenia λ_{ex} 275 nm.



Rys. 2. Emisyjne widma fluorescencyjne HSA o stężeniu $3 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ w obecności Salt4 o wzrastającym stężeniu ($3 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \div 2.4 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), przy długości fali wzbudzenia λ_{ex} 295 nm.

Na podstawie rejestrowanych emisyjnych widm fluorescencyjnych HSA w obecności Salt4 o wzrastającym stężeniu obliczono procent wygaszania fluorescencji w granicach $30 \pm 5\%$. W badaniach przeprowadzonych przez Owczarzy i in. polegających na analizie oddziaływań chlorku 9-fluoro-5-alkilo-12(H)-chino[3,4-b][1,4]benzotiazyny z modelowymi białkami surowicy krwi, również uzyskano procent wygaszania fluorescencji HSA na poziomie 30% dla λ_{ex} 275nm oraz 29% dla λ_{ex} 295 nm, co może świadczyć o słabym oddziaływaniu Salt4 z HSA (Owczarzy i in 2021).

Zjawisko wygaszania fluorescencji może mieć charakter dynamiczny, statyczny i/lub mieszany (Kirby EP 1971) Przeprowadzone badania pilotażowe sugerują, że oddziaływanie pomiędzy Salt4 a HSA ma charakter statyczny, co prawdopodobnie świadczy o tworzeniu kompleksu

Salt4-HSA. Zostało to określone na podstawie krzywych Sterna-Volmera, stałej Sterna-Volmera (K_S) oraz bimolekularnej stałej wygaszania fluorescencji (k_q).

Na podstawie równania Klotza podjęto się próby wyznaczenia stałej asocjacji (K_a) oraz liczby klas miejsc wiązania (n) (Klotz i Hunston 1971). Uzyskano stałe asocjacji kompleksu Salt4-HSA, zarówno dla długości fali wzbudzenia λ_{ex} 275 nm, jak i λ_{ex} 295 nm rzędu 10^4 , a liczba n wynosiła około 1, co również może świadczyć o tworzeniu słabego kompleksu Salt4-HSA z jedną klasą miejsca wiązania w cząsteczce HSA o wysokim powinowactwie (Klotz i Hunston 1971).

4. Wnioski

- Techniki spektroskopowe (spektrofluorymetria, spektroskopia UV-VIS) są użytecznym narzędziem do analizy interakcji pomiędzy nowo zsyntetyzowaną substancją a głównym białkiem transportującym krwi.
- Na podstawie równania Sterna-Volmera oraz obliczonych bimolekularnych stałych wygaszania fluorescencji można przypuszczać, że wygaszanie fluorescencji białka w obecności Salt4 ma charakter statyczny, co wskazuje na możliwość tworzenia się kompleksu.
- Wstępnie obliczone na podstawie równania Klotza stałe asocjacji (K_a) oraz liczba klas miejsc wiązania (n) badanego układu mogą wskazywać na tworzenie słabego kompleksu Salt4-HSA z jednym miejscem wiązania w cząsteczce HSA o wysokim powinowactwie.
- Na podstawie wstępnie przeprowadzonych pilotażowych badań można przypuszczać, że Salt4 słabo oddziałuje z HSA (głównym białkiem surowicy ludzkiej), przez co może wywołać silny efekt terapeutyczny i toksyczny, dlatego konieczna jest kontynuacja badań z wykorzystaniem innych białek transportujących krwi np. α_1 kwasną glikoproteinę (AGP) czy γ globulinę ludzką (HGG) lub inne techniki.

5. Podziękowania

Podziękowania dla Pana dr hab. n. farm. Andrzeja Zięby, prof. SUM, za możliwość wykonania badań z użyciem 9-hydroksy-5-metylo-12(H)-chino[3,4-b][1,4]benzotiazyna (Salt4). Przedstawione badania zostały częściowo sfinansowane z umowy statutowej PCN-2-012/K/2/F, PCN-1-022/K/2/F, PCN-2-030/K/2/F, PCN-2-011/K/2/F (Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach)

6. Literatura

- Bteich M (2019) An overview of albumin and alpha-1-acid glycoprotein main characteristics: highlighting the roles of amino acids in binding kinetics and molecular interactions. *Heliyon* 5(11): e02879.
- Fanali G i in. (2012) Human serum albumin: From bench to bedside. *Molecular Aspects of Medicine* 33: 209–290.
- Ferreira CP i in. (2020) Application of the UV-vis spectrophotometry method for the determination of glutamate in the cerebrospinal fluid of rats. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 15: 113290.
- Gentleman AS i in. (2022) Stern–Volmer analysis of photocatalyst fluorescence quenching within hollow-core photonic crystal fibre microreactors. *Chemical Communications* 58: 10548–10551.
- Ghuman J i in. (2005) Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *Journal of Molecular Biology* 353: 38–52.
- Kirby EP (1971) Experimental techniques, chapter 2, in. *Excited states of protein and nucleic acids*, ed. Steiner, R.F. Weinryb, I. Plenum Press: New York, NY, USA, 27–61
- Klotz IM, Hunston DL (1971) Properties of graphical representations of multiple classes of binding sites. *Biochemistry* 10: 3065–3069.
- Mocanu S i in. (2018) New environment-sensitive bis-dansyl molecular probes bearing alkyl diamine linkers: emissive features and interaction with cyclodextrins. *Chemical Physics Letters*: 713, 226–234.

- Moman RN I in. M. Physiology, Albumin; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459198/> [dostęp online: 04.08.2023]
- Owczarzy A i in. (2022) Zastosowanie preparatów albuminowych w lecznictwie. Poszerzamy horyzonty 30.
- Owczarzy A i in. (2023) Spectroscopic Studies of Quinobenzothiazine Derivative in Terms of the In Vitro Interaction with Selected Human Plasma Proteins. Part 2. *Molecules* 10: 698.
- Owczarzy A i in. (2021) Spectroscopic Studies of Quinobenzothiazine Derivative in Terms of the In Vitro Interaction with Selected Human Plasma Proteins. Part 1. *Molecules* 26: 4776.
- Sochacka J, Baran W (2012) The investigation of the binding of 6-mercaptopurine to site I on human serum albumin. *The Protein Journal* 31: 689–702.
- Sudlow G I in. (1972) Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin. *Molecular Pharmacology* 12: 1052–1061.
- Traczyk WZ (2022) *Fizjologia człowieka w zarysie*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, Wydanie 8.
- Weaving G I in. (2016) Age and sex variation in serum albumin concentration: an observational study. *Annals of Clinical Biochemistry*. 53: 106-111.
- Valeur B (2009) *Molecular fluorescence, Principles and Applications*. Wiley-VCH, Weinheim, 34–123.
- Yamasaki K i in. (1996) Characterization of site I on human serum albumin: concept about the structure of a drug binding site. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2: 147-157.
- Zhang J I in. (2012) Interaction of pyrrolizine derivatives with bovine serum albumin by fluorescence and UV-Vis spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 96: 132–138.

4. Zastosowanie spektroskopii UV-Vis w badaniach środowiskowych - oznaczanie stężenia jonów żelaza oraz pH wód stojących znajdujących się na terenie Ośrodka Edukacji Ekologiczno-Geologicznej GEOsfera w Jaworznie

Application of UV-Vis spectroscopy in environmental research – determination of iron ion concentration and pH of standing waters located in the area of the GEOsfera Environmental and Geological Education Centre in Jaworzno

Rogóż Wojciech⁽¹⁾, Górnjak Nicole⁽²⁾, Owczarzy Aleksandra⁽¹⁾, Chećko Agnieszka⁽³⁾, Maciążek-Jurczyk Małgorzata⁽¹⁾

⁽¹⁾ Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec

⁽²⁾ Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Farmacji Fizycznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec

⁽³⁾ Instytut Nauk o Ziemi, Uniwersytet Śląski w Katowicach; Gmina Miasta Jaworzno

Maciążek-Jurczyk Małgorzata: mmaciazek@sum.edu.pl

Rogóż Wojciech: wrogoz@sum.edu.pl

Słowa kluczowe: spektroskopia, żelazo, pH, wody stojące

Streszczenie

Spektroskopia UV-Vis jest niezwykle użyteczną techniką badawczą, dzięki której możliwe jest prowadzenie badań o profilu farmaceutycznym, medycznym lub środowiskowym. Celem niniejszej pracy było zbadanie stężenia jonów żelaza (Fe^{3+}) oraz wyznaczenie wartości pH w wodach stojących, zlokalizowanych na terenie Ośrodka Edukacji Ekologiczno-Geologicznej GEOsfera w Jaworznie. W celu oznaczenia stężenia jonów żelaza zastosowano metodę rodankową, natomiast aby wyznaczyć pH badanych próbek, wykorzystano roztwór błękitu bromotymolowego. Pomiar przeprowadzono z użyciem spektroskopii UV-Vis (spektrofotometr UV-Vis JASCO V-760/V-730).

Z przeprowadzonych pomiarów spektroskopowych wynika, że zawartość jonów żelaza w próbkach badanych nie przekraczała $1.6 \text{ [mg/dm}^3\text{]}$. Z uwagi na ograniczenia metody, nie było możliwości dokładniejszego wyznaczenia stężenia badanych jonów. Wartość pH każdej z badanych próbek mieściła się w zakresie od 7 do 8. Oznacza to, że odczyn badanych próbek wód stojących był lekko zasadowy lub zbliżony do obojętnego.

Spektroskopia UV-Vis to metoda badawcza, która pozwala na prowadzenie szeroko zakreślonych badań między innymi środowiskowych, dotyczących właściwości fizykochemicznych wód stojących. Uzyskane wyniki stanowią istotny wkład w badania środowiskowe terenu Ośrodka Edukacji Ekologiczno-Geologicznej GEOsfera w Jaworznie.

1. Wstęp

Opuszczone wyrobiska poeksploatacyjne są powszechnym elementem krajobrazu charakterze industrialnym i post industrialnym. Pogórnicy charakter tych obszarów sprawia, że są nisko oceniane pod względem ich wartości przyrodniczej. Mimo to są przedmiotem zainteresowania nieformalnych użytkowników. Obszary te są coraz częściej doceniane pod względem ich potencjału naukowego, obejmującego elementy przyrody nieożywionej i obiekty kulturowe. Umożliwienie legalnego korzystania z terenów przemysłowych, wymaga potwierdzenia warunków bezpieczeństwa, pozwalającego na ich użytkowanie jako terenów publicznych. Analiza terenów wydzielonych w procesie eksploatacji z otoczenia przez ściany i spąg wyrobiska winna obejmować wszystkie jej komponenty na poziomie formy, struktury i składu oraz stan jakościowy i ilościowy wód. Obecność wody w wyrobiskach pogórnicych definiuje możliwość ich efektywnego

zagospodarowania. Wyniki badań opisane w niniejszej pracy objęły parametry jakości wód powierzchniowych i podziemnych. Z uwagi na możliwości ich zagospodarowania w obszarze ogólnodostępnej rekreacji, czy możliwości wykorzystania do celów zaopatrzeniowych, konieczna była ich ocena pod kątem zawartości substancji o możliwych działaniach toksycznych. Wyniki potwierdzające dobry stan wód na badanym terenie przemysłowym stanowią bowiem skuteczne wsparcie procesu transformacji terenów pogórnicych. Badania nad tym zagadnieniem mogą być prowadzone przy pomocy metod spektroskopowych. Stanowią one użyteczne narzędzie w prowadzeniu różnorodnych analiz, w tym badań środowiskowych. Spektroskopia UV-Vis znajduje zastosowanie w analizie ilościowej i jakościowej substancji nieorganicznych, organicznych oraz w analizie struktury związków chemicznych. Pozwala między innymi na odróżnienie układów sprzężonych od niesprzężonych, izomerii geometrycznej i izomerii podstawienia w związkach aromatycznych. Spektroskopia bada oddziaływanie promieniowania elektromagnetycznego z materią podczas których dochodzi do zmian energii ΔE cząsteczek. Źródłem światła w spektroskopii UV-Vis w zakresie nadfioletu (λ 200-380 nm) są lampy deuterowe, natomiast w zakresie widzialnym (λ 380-800 nm) lampy halogenowe. Emitowane promieniowanie polichromatyczne kieruje się przez szczelinę wejściową monochromatora Czernego-Turnera na siatkę dyfrakcyjną, która stanowi element rozszczepiający światło. Jej obrót powoduje zmianę długości fali promieniowania monochromatycznego, czyli zmianę długości fali (Jóźwiak i Bartosz 2005). Wiązka po wyjściu z monochromatora jest kierowana na rozdzielacz, wirujące koło podzielone na trzy równe części. Cykl rozpoczyna się „trafieniem” wiązki światła na przesłonę, gdzie światło nie jest przepuszczane. Po obrocie koła pada na część pokrytą zwierciadłem kierując wiązkę na kuwetę z układem odniesienia. Po kolejnym obrocie przechodzi przez pustą część koła na kuwetę z próbką badaną. Następnie każda z wiązek jest przetwarzana przez detektor na energię elektryczną, która jest dodatkowo wzmacniana przez działanie fotopowielacza (Ciszewska 2005).

Celem pracy było określenie wartości pH oraz stężenia jonów żelaza (Fe^{3+}) w wodach stojących, znajdujących się na terenie nieczynnego wyrobiska wapienia dolomitycznego Sadowa Góra w Jaworznie.

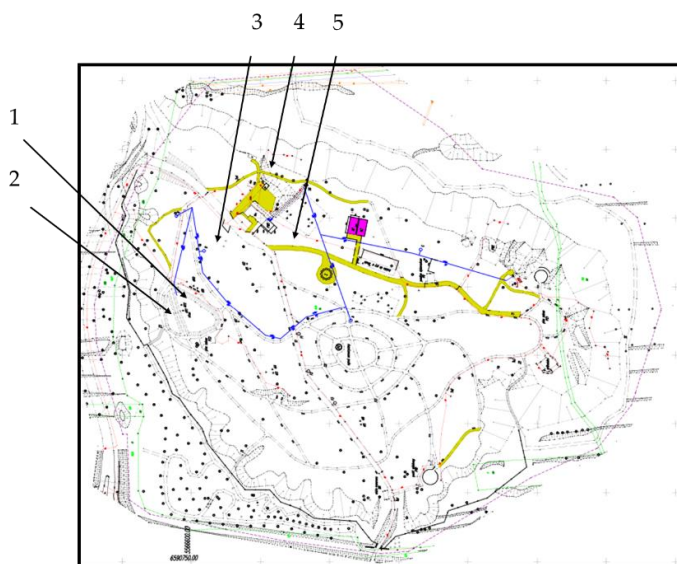
2. Materiał i Metody

Badania prowadzono w oparciu o próbki pobrane na przełomie zimy i wiosny 2023 roku z terenu Ośrodka Edukacji Ekologiczno-Geologicznej GEOsfera w Jaworznie. Analizie poddano pięć próbek wód stojących (W1- woda ze stawu nr 1; W2- woda ze stawu nr. 2; W3- woda z terenu podmokłego; W4- woda ze studni głębinowej; W5- woda z okolicy nieczynnej tężni solankowej). Dokładne zestawienie lokalizacji miejsc, z których pobrano próbki, wraz z ich oznaczeniem umieszczono w Tab. 1 oraz w Rys. 1.

Wśród zastosowanych odczynników niezbędnych do wykonania zaplanowanych pomiarów znalazły się: diwodorofosforan sodu 2 hydrat, wodorofosforan dipotasu, chlorek żelaza (III), błękit bromotymolowy (firma EuroChem BGD), rodanek potasu (firma Merc KGaA) oraz kwas solny 1 [mol/dm³] (firma Chempur). W celu określenia stężenia jonów Fe^{3+} posłużono się metodą rodankową. Jej najważniejsze założenie polega na tym, iż w wyniku reakcji kationów żelaza Fe^{3+} z anionami rodankowymi SCN^- powstaje barwny (czerwony) związek kompleksowy, wykazujący zdolność do absorpcji promieniowania UV-VIS.

Tab. 1. Lokalizacja miejsca poboru próbek z terenu Ośrodka Edukacji Ekologiczno-Geologicznej GEOsfera w Jaworznie.

Oznaczenie badanej próbki	Lokalizacja miejsca poboru próbek
W1	woda ze stawu nr. 1
W2	woda ze stawu nr. 2
W3	woda z terenu podmokłego
W4	woda ze studni głębinowej
W5	woda z okolicy nieczynnej tężni solankowej



Rys.1. Mapa Ośrodka Edukacji Ekologiczno-Geologicznej GEOsfera w Jaworznie z dodanymi do niej strzałkami i numerami oznaczającymi lokalizację poszczególnych miejsc poboru próbek (mapa: zasób Gminy Miasta Jaworzna; za zgodą).

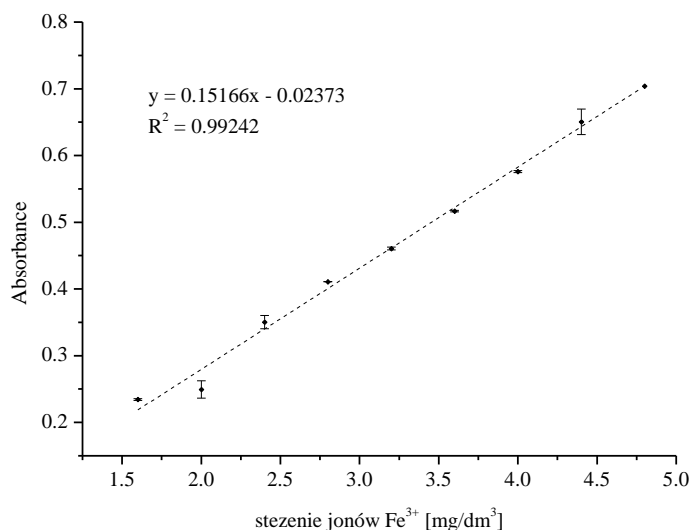
Pojedynczą próbkę wody od W1 do W5 przygotowano poprzez zmieszanie badanej wody z kwasem solnym 1 ($[\text{mol}/\text{dm}^3]$) oraz 10% roztworu rodanku potasu w stosunku objętościowym (v:v:v) 19:1:5. Do przygotowania krzywej wzorcowej zastosowano roztwory wzorcowe chlorku żelaza (III) o stężeniu jonów Fe^{3+} : 1.60, 2.00, 2.40, 2.80, 3.20, 3.60, 4.00, 4.40, 4.80 $[\text{mg}/\text{dm}^3]$. Pomiarów wykonywano w zakresie długości fali od 350 nm do 550 nm. Na podstawie uzyskanych widm absorpcyjnych roztworów wzorcowych wyznaczono krzywą wzorcową oraz analityczną długość fali λ 479 nm. Przy tworzeniu protokołu metody rodankowej korzystano z dostępnych prac badawczych innych autorów (Najib i in. 2011, de Berg i in. 2016).

Do oznaczenia pH zastosowano etanolowy roztwór błękitu bromotymolowego (wskaźnik kwasowo-zasadowy) (0.05%; woda:etanol 20:80 (v/v)). Wskaźnik ten zmienia kolor (a co za tym idzie, kształt widma absorpcyjnego) pod wpływem zmian pH roztworu. Aby wyznaczyć krzywą zależności absorbancji błękitu bromotymolowego w zależności od wartości pH przygotowano roztwory buforu fosforanowego o wzrastającym pH: 1.0, 4.5, 6.2, 6.6, 6.9, 7.2, 7.6, 7.9, 9.1, 13.0. Próbkę przeznaczoną do analizy spektroskopowej wykonano przez zmieszanie roztworu błękitu bromotymolowego oraz badanej próbki (wzorcowy bufor fosforanowy lub próbka W1-W5) w stosunku objętościowym (v:v) 1:24. Pomiarów wykonywano w zakresie długości fali od 250 nm do 750 nm. Na podstawie uzyskanych widm absorpcyjnych roztworów wskaźnika o różnym pH wyznaczono analityczną długość fali, która wynosiła λ 616 nm. Przy tworzeniu protokołu pomiarów z udziałem błękitu bromotymolowego wykorzystano pracę Hou i in. (Hou i in. 2017).

Wszystkie pomiary wykonano w temperaturze pokojowej, przy użyciu spektrofotometrów UV-Vis firmy JASCO: V-730/V-760. Zastosowano kuwety kwarcowe o długości drogi optycznej 10 mm. W niniejszej pracy dane zostały zaprezentowane jako średnia \pm odchylenie standardowe (SD). Realizacja niniejszego badania była możliwa dzięki współpracy Katedry i Zakładu Farmacji Fizycznej Wydziału Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach z Ośrodkiem Edukacji Ekologiczno-Geologicznej GEOsfera w Jaworznie.

3. Wyniki i dyskusja

Aby możliwa była realizacja celu niniejszej pracy, w pierwszej kolejności przeanalizowano wyniki pomiarów stężenia jonów żelaza w przebadanych próbkach wody stojącej. Rys.2. przedstawia wykres zależności absorbancji od stężenia jonów Fe^{3+} w wodzie $[\text{mg}/\text{dm}^3]$.



Rys. 2. Wykres zależności absorbancji od stężenia jonów Fe^{3+} w wodzie [mg/dm^3].

Na podstawie danych zaprezentowanych na Rys. 2 wyznaczono średnie wartości stężeń jonów Fe^{3+} w badanych próbkach wody stojącej. Wyniki obliczeń zostały zaprezentowane w Tab. 2.

Tab. 2. Średnie wartości absorbancji oraz stężeń jonów Fe^{3+} w badanych próbkach wody stojącej.

Oznaczenie badanej próbki	Średnie stężenie jonów $\text{Fe}^{3+} \pm$	
	Średnia wartość absorbancji \pm SD*	SD* [mg/dm^3]
W1	0.008 \pm 0.003	0.209** \pm 0.022
W2	0.015 \pm 0.001	0.256** \pm 0.005
W3	0.011 \pm 0.011	0.226** \pm 0.071
W4	0.008 \pm 0.004	0.210** \pm 0.028
W5	0.020 \pm 0.006	0.245** \pm 0.081

*SD – odchylenie standardowe

** – wartości szacunkowe

Żelazo jest jednym z najpowszechniej występujących naturalnie pierwiastków w skorupie ziemskiej. Wzrost stężenia jego form jonowych w środowisku, zwłaszcza w wodzie, wiąże się z zanieczyszczeniami pochodzącymi ze ścieków zakładów przemysłowych, kopalni węgla i rud żelaza oraz z ulegających korozji elementów dystrybucji wody. Zgodnie z zaleceniami Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) stężenie żelaza w wodzie nie powinno przekraczać 0.2 [mg/dm^3]. Na jakość wód powierzchniowych i podziemnych mogą mieć istotny wpływ także wahania wartości pH (Maziarka i in. 2018). W żadnej z przebadanych próbek stężenie jonów Fe^{3+} nie przekraczało 1.60 [mg/dm^3]. Dokładniejsze określenie stężenia kationów żelaza nie było możliwe, z uwagi na ograniczenia metody i zbyt niskie stężenie analizowanych jonów w próbkach. Wartości stężeń zaprezentowane w Tab. 2. mają wyłącznie charakter szacunkowy i mogą być traktowane wyłącznie jako wstępny etap badań. Oznacza to, iż w oparciu o zastosowaną technikę badawczą nie ma możliwości określenia, czy stężenie jonów Fe^{3+} w zbiornikach wody stojącej na terenie Ośrodka Edukacji Ekologiczno-Geologicznej GEOsfera w Jaworznie mieści się w zakresie dopuszczalnym

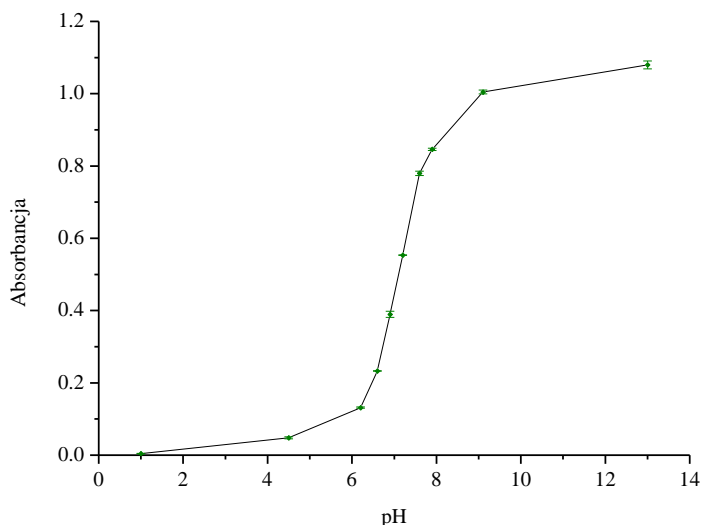
przez WHO. Sugeruje się zastosowanie innych technik badawczych, zapewniających większą czułość pomiaru, takich jak np. absorpcyjna spektrometria atomowa (Tautkus i in. 2004).

W Tab. 3. przygotowano zestawienie wartości pH poszczególnych roztworów buforowych, jakie zastosowano w celu sporządzenia krzywej zależności absorbancji od wartości pH, oraz odpowiadające im średnie wartości absorbancji. Z kolei Ryc. 3 przedstawia wykres zależności absorbancji od pH.

Tab. 3. Średnie wartości absorbancji błękitu bromotymolowego wraz z pH.

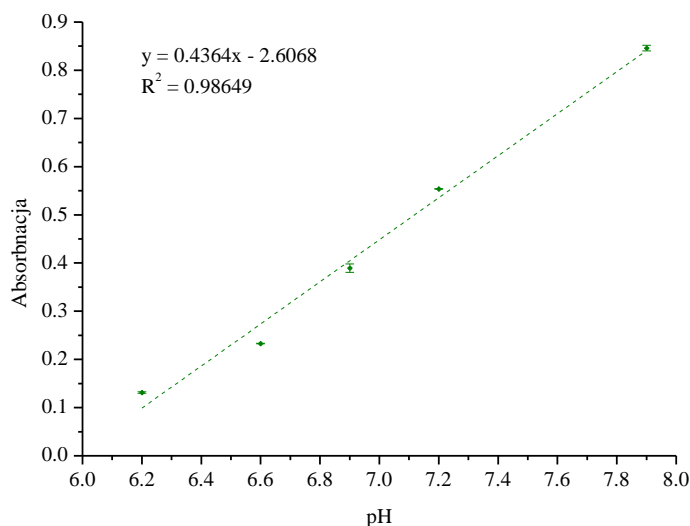
Oznaczenie badanej próbki	Wartość pH	Średnia wartość absorbancji \pm SD*
Bufor 1	1.0	0.004 \pm 0.000
Bufor 2	4.5	0.048 \pm 0.003
Bufor 3	6.2	0.131 \pm 0.002
Bufor 4	6.6	0.233 \pm 0.001
Bufor 5	6.9	0.390 \pm 0.009
Bufor 6	7.2	0.554 \pm 0.001
Bufor 7	7.6	0.780 \pm 0.006
Bufor 8	7.9	0.846 \pm 0.003
Bufor 9	9.1	1.005 \pm 0.005
Bufor 10	13.0	1.080 \pm 0.011

*SD – odchylenie standardowe



Rys. 3. Wykres zależności absorbancji od wartości pH w zakresie od 1 do 13.

Na podstawie Rys. 3 wykreślono wykres zależności absorbancji od pH w zakresie od 6.2 do 7.9, gdzie wzrost absorpcji promieniowana próbki wraz ze wzrostem pH ma postać liniową (Rys. 4).



Rys. 4. Wykres zależności absorbnacji od wartości pH w zakresie od 6.2 do 7.9.

W oparciu o krzywą wzorcową (Rys. 4) wyznaczono wartości pH dla poszczególnych próbek wód stojących (Tab. 4).

Tab. 4. Średnie wartości absorbnacji oraz wartości pH badanych próbek wody stojącej.

Oznaczenie badanej próbki	Średnia wartość absorbnacji ± SD*	Średnia wartość pH ± SD*
W1	0.822 ± 0.017	7.857 ± 0.040
W2	0.678 ± 0.003	7.528 ± 0.007
W3	0.759 ± 0.006	7.713 ± 0.014
W4	0.665 ± 0.022	7.497 ± 0.051
W5	0.812 ± 0.006	7.834 ± 0.005

*SD – odchylenie standardowe

Na podstawie przeprowadzonych badań spektroskopowych wykazano, że najwyższą wartość pH miała próbka wody oznaczona numerem W1. Pochodziła ona z dobrze nasłonecznionego stawu nr.1. Z kolei najniższa wartość pH, zbliżona do 7.5, została zanotowana dla próbki W4 pochodzącej ze studni głębinowej. Wartość pH badanych próbek mieściła się w zakresie od ok 7.5 do ok 7.9. Na tej podstawie można stwierdzić, że odczyn wody stojącej w zbiornikach wodnych na terenie Ośrodka Edukacji Ekologiczno-Geologicznej GEOSfera w Jaworznie był lekko zasadowy lub zbliżony do obojętnego. Wartość pH wody jest bardzo istotnym kryterium oceny jej czystości. Jak podaje norma WHO (WHO/SDE/WSH/07.01/1), optymalne pH wody pitnej mieści się w zakresie od 6.5 do 9.5 (Fawell). Daje to nadzieję, że w wyniku dalszych badań w przyszłości woda z obszarów pogórnich zostanie uznana za bezpieczną.

4. Wnioski

- a. Spektroskopia UV-Vis to efektywna metoda badawcza, która pozwala na prowadzenie niektórych badań środowiskowych, w tym dotyczących właściwości wód stojących

- b. Metoda rodankowa, zakładająca wykorzystanie spektroskopii UV-Vis do badania stężenia jonów Fe^{3+} okazała się niedostatecznie czuła, by umożliwić wyznaczenie dokładnego stężenia kationów żelaza w zbiornikach wody stojącej
- c. Wykorzystanie spektroskopii UV-Vis do badania zmian absorpcji promieniowania wskaźnika pH, jakim jest błękit bromotymolowy, pozwoliło na precyzyjne określenie średniej wartości pH wód stojących, które mieściło się w zakresie od 7.497 ± 0.051 do 7.857 ± 0.040
- d. Uzyskane wyniki stanowią istotny wkład w badania środowiskowe terenu Ośrodka Edukacji Ekologiczno-Geologicznej GEOsfera w Jaworznie.

5. Podziękowania

Przedstawione badania zostały częściowo sfinansowane z umowy statutowej PCN-2-012/K/2/F, PCN-1-022/K/2/F, PCN-2-030/K/2/F, PCN-2-011/K/2/F (Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach).

6. Literatura

- Ciszewska M (2012) Badanie rozdzielczości czasowej detektorów scyntylicyjnych pod kątem ich użycia w pozytonowej tomografii emisyjnej, Praca magisterska: 19.
- de Berg K i in. (2016) A new approach to the equilibrium study of iron(III) thiocyanates which accounts for the kinetic instability of the complexes particularly observable under high thiocyanate concentrations. *Inorganica Chimica Acta* 445: 155–159.
- Fawell JK. pH in Drinking-water. Revised background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. WHO/SDE/WSH/07.01/1; https://cdn.who.int/media/docs/default-source/wash-documents/wash-chemicals/ph.pdf?sfvrsn=16b10656_4 [data cytowania 10.08.2023 r.].
- Hou H i in. (2017) Single-cell pH imaging and detection for pH profiling and label free rapid identification of cancer cells. *Scientific Reports* 7(1759): 1–8.
- Jóźwiak Z, Bartosz G (2005) Biofizyka. Wybrane zagadnienia wraz z ćwiczeniami: 105–125.
- Maziarka D, Krogulska B (2018) Żelazo w wodzie przeznaczonej do spożycia przez ludzi. Znaczenie i zagrożenia dla bezpieczeństwa zdrowotnego. Postępowanie w przypadku podwyższonych wartości stężeń. © Główny Inspektorat Sanitarny Warszawa 2018; <https://www.gov.pl/attachment/f80296a6-24c7-40d4-8a61-81606907fe6b> [data cytowania 20.03.2023 r.].
- Najib FM, Hayder OI (2011) Study of stoichiometry of ferric thiocyanate complex for analytical purposes including F^- - determination. *Iraqi National Journal of Chemistry* 42: 135–155.
- Tautkus S i in. (2004) Determination of iron in natural and mineral waters by flame atomic absorption spectrometry. *Journal of the Serbian Chemical Society* 69(5): 393–402. https://www.chemia.uni.lodz.pl/fileadmin/Wydzialy/Wydzial_Chemii/Jednostki/KChF/pdf/26.pdf [data cytowania 10.08.2023].

5. Badania 6-acetyloaminobutylo-9-chlorochino[3,2-b]benzo[1,4]tiazyny i próba jej enkapsulacji w nanocząstkach albuminy surowicy ludzkiej. Pilotażowa analiza spektroskopowa.

Studies of 6-acetylaminobutyl-9-chloroquino[3,2-b]benzo[1,4]thiazine and an attempt to encapsulate it in human serum albumin nanoparticles. Pilot spectroscopic analysis.

Sarkowicz Patrycja⁽¹⁾, Kulig Karolina⁽²⁾, Maciążek- Jurczyk Małgorzata⁽²⁾

⁽¹⁾Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Farmacji Fizycznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

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

Karolina Kulig: s83464@365.sum.edu.pl, kkulig@sum.edu.pl

Małgorzata Maciążek-Jurczyk: mmaciazek@sum.edu.pl

Słowa kluczowe: nanotechnologia, spektroskopia, spektrofluorymetria

Streszczenie

W ostatnich latach zainteresowanie naukowców nanocząstkami albuminowymi znacznie wzrosło. Liczne badania dostarczyły informacji na temat ich zastosowania w terapii, jak i diagnostyce obrazowej. Dostarczanie leków z zastosowaniem nanostruktur może wiązać się z lepszą zdolnością docierania do ściśle określonego miejsca działania leku, co skutkuje zmniejszeniem działań niepożądanych oraz poprawą skuteczności terapii. Federalny Urząd Żywności i Leków (FDA) zatwierdził albuminę surowicy ludzkiej (HSA, *ang.* human serum albumin) przy tworzeniu nowych systemów dostarczania leku (DDS, *ang.* drug delivery systems). Istnieje kilka leków, które są stosowane w praktyce klinicznej w postaci nanocząstek związanych z albuminą. Trójcykliczne fenotiazyny z podstawnikami aminoalkilowymi przy atomie azotu reprezentują klasę związków wykazujących różne aktywności biologiczne, między innymi: neuroleptyczne, przeciwhistaminowe, przeciwkaszlowe i przeciwwymiotne. Ponadto, ważne właściwości przeciwpowrotkowe, przeciwnowotworowe, przeciwbakteryjne i związane z nimi działanie zapobiegające oporności wielolekowej (MDR). Ponadto 6-acetyloaminobutylo-9-chlorochino[3,2-b]benzo[1,4]tiazyna (QBT) wykazała skuteczność terapeutyczną w łagodzeniu miejscowych i ogólnoustrojowych zmian patologicznych związanych z chemicznie indukowanym zapaleniem jelita grubego u myszy.

Celem projektu było przeprowadzenie badań spektroskopowych w celu lepszego zrozumienia struktury i potencjalnych badań farmakokinetycznych związku. Metoda desolwatacji posłużyła do zamknięcia leku w nanostrukturach HSA. Roztwór QBT do badań spektroskopowych przygotowano w DMSO, a następnie rozcieńczono. W celu oceny właściwości QBT wykorzystano spektroskopię UV-Vis (JASCO V-760) oraz spektroskopię fluorescencyjną (JASCO FP-6500). Enkapsulację leku do nanocząstek albuminy surowicy ludzkiej przeprowadzono metodą desolwatacji.

Widmo absorpcyjne próbki o stężeniu 2×10^{-5} [mol L⁻¹] charakteryzowało się trzema wyraźnymi pikami, a badania spektrofluorescencyjne wykazały, że QBT fluoryzuje przy długości fali wzbudzenia w zakresie od 240 do 550 nm. Weryfikacja skuteczności enkapsulacji potwierdziła, że QBT może zostać enkapsulowany do nanocząstek HSA.

QBT charakteryzuje się zdolnością do pochłaniania promieniowania w zakresie UV-Vis i emisji fluorescencji, co jest użytecznym narzędziem do badań ilościowych. Wartość wydajności enkapsulacji wykazała możliwość wiązania QBT do HSA.

1. Wstęp

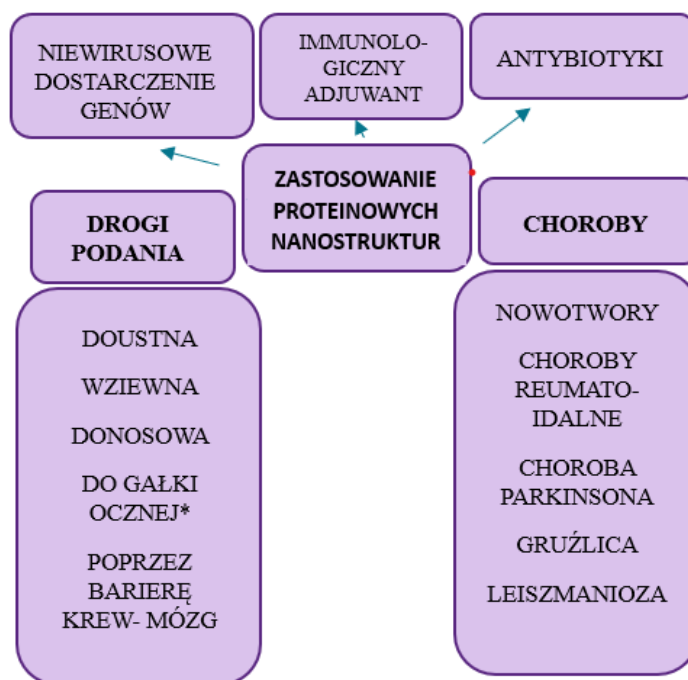
Nanonauka jest dziedziną zajmującą się badaniem struktur i cząstek w zakresie od 1 do 100 nm, natomiast nanotechnologia dotyczy ich praktycznych zastosowań. Terminy zostały wdrożone w wielu dyscyplinach, w tym w fizyce, chemii, biologii, inżynierii, a także elektronice. Warto zauważyć, że w ostatnich latach ze względu na obiecujące wyniki, zwłaszcza w leczeniu chorób nowotworowych, stały się przedmiotem ogromnego zainteresowania medyków. W ciągu zaledwie kilku dekad nanotechnologia i nanonauka zyskały fundamentalne znaczenie dla zastosowań przemysłowych i urzędzeń medycznych, takich jak bioczuJNIki diagnostyczne, systemy dostarczania leków oraz sondy obrazujące. Ostatnie postępy dostarczyły szeregu nanomateriałów o unikalnych właściwościach, m. in. zdolności dostarczania cząstek terapeutycznych, takich jak leki, białka czy kwasy nukleinowe do ściśle określonego miejsca działania (Bayda i in. 2019). Prowadzone badania dotyczące nanostruktur są motywowane wyeliminowaniem przeszkód utrudniających osiągnięcie sukcesu terapeutycznego w tradycyjnym leczeniu farmakologicznym (Contera i in. 2020). Chemioterapia powszechnie stosowana w leczeniu nowotworów wiąże się z niszczeniem również prawidłowych, szybko dzielących się komórek organizmu m.in. mieszków włosowych, szpiku kostnego oraz komórek przewodu pokarmowego (Pérez-Herrero i in. 2015). Obiecującą strategią do zwiększenia skuteczności terapii oraz zmniejszenia jej skutków ubocznych jest wiązanie preparatów przeciwnowotworowych z nowymi systemami dostarczania leków (DDS, *ang.* drug delivery systems), takimi jak nanocząstki (NP, *ang.* nanoparticles). Ich rola umożliwia zmniejszenie toksyczności, zoptymalizowanie działania środków leczniczych oraz odpowiednie rozmieszczenie w organizmie i/lub przezwyciężenie oporności wielolekowej (Dreis i in. 2007). DDS nie tylko transportują środki chemioterapeutyczne do tkanki zmienionej chorobowo, unikając negatywnego wpływu na zdrowie, a także chronią leki cytotoksyczne przed degradacją, zwiększają okres półtrwania, rozpuszczalność środków cytotoksycznych oraz zmniejszają klirens nerkowy (Pérez-Herrero i in. 2015).

Jednym z najczęściej stosowanych polimerów naturalnych jest łatwo dostępne białko – albumina surowicy, zatwierdzona do tych celów przez Federalny Urząd Żywności i Leków (FDA, *ang.* Food and Drug Administration) (Karimi i in. 2016). Albuminy jako grupa białek, pełnią wiele ważnych funkcji fizjologicznych, do których należy regulacja ciśnienia osmotycznego w łożysku naczyniowym, utrzymanie prawidłowego pH krwi czy wiązanie i transport wielu endogennych związków oraz ksenobiotyków, w tym również hydrofobowych substancji leczniczych (Konopska i in. 2018). Ze względu na wysoką zdolność wiązania leku, niską immunogenność oraz brak toksyczności, przyciągają uwagę wielu badaczy. Właściwości te w połączeniu z dobrą biokompatybilnością i biodegradowalnością sprawiły, że okazały się idealnym nośnikiem do dostarczania leków i genów. Do tej pory wyizolowano różne rodzaje białek albuminy, w tym albuminę jaja kurzego (OVA, *ang.* ovalbumin), albuminę surowicy ludzkiej (HSA, *ang.* Human Serum Albumin), albuminę surowicy bydlęcej (BSA, *ang.* Bovine Serum Albumin) i albuminę surowicy szczura (RSA, *ang.* Rat Serum Albumin). Zostały one wykorzystane do różnych zastosowań biomedycznych. HSA jest globularnym, rozpuszczalnym w wodzie białkiem syntetyzowanych przez hepatocyty. To pojedynczy polipeptyd zbudowany z 585 aminokwasów, o wysokiej zawartości cysteiny i niskiej zawartości tryptofanu. Jej masa cząsteczkowa wynosi 65-70 kDa a okres półtrwania w organizmie 19 dni. Jest stabilna w zakresie pH 4-9 i może przetrwać w temperaturze do 60°C przez 10 godzin. Struktura drugorzędowa albuminy składa się w 67% z helisy α i posiada 17 mostków disiarczkowych (Karimi i in. 2016).

Głównym celem projektowania NP, jako systemu dostarczania leków, jest kontrola ich wielkości, powierzchni oraz jej właściwości. To ważna kwestia, ponieważ nanostruktury transportujące wymaganą ilość leku muszą wykazywać pożądaną aktywność farmakologiczną poprzez uwalnianie substancji czynnych w celu osiągnięcia działania specyficznego dla danego miejsca. Istnieje kilka różnych technik, dzięki którym można otrzymać NP. (Karimi i in. 2016). W praktyce występują trzy główne metody syntezy albuminowych nanocząstek, w tym: metoda desolvatacji, emulsyfikacji, termicznego żelowania. Ponadto metoda suszenia nanorozpyłowego czy nab-technologie (NAB™) (Meng i in. 2022). Metoda desolvatacji, inaczej nazywana jako metoda

koacerwacji, została opracowana już w 1978 roku (Jahanban-Esfahlan i in. 2016). Polega na dodaniu środka odwadniającego, jakim jest alkohol, w celu usunięcia uwodnionej błony białka. Proces ten stosuje się podczas ciągłego mieszania np. za pomocą mieszadła magnetycznego. Powoduje to odsłonięcie obszaru hydrofobowego albuminy i tym samym zmniejszenie jej rozpuszczalności (Meng i in. 2022). Objętość i szybkość dodawania środka desolwatujuącego ma wpływ na wielkość otrzymanych cząstek (Jahanban-Esfahlan i in. 2016). Synteza stabilnych nanostruktur jest możliwa dzięki zastosowaniu denaturacji termicznej lub sieciowania chemicznego. Najczęściej wykorzystuje się do tego celu aldehyd glutarowy (Meng i in. 2022). Ze względu na komercyjną dostępność i niską cenę glutałaledehydu możliwe jest jego stosowanie w szerokim spektrum reakcji chemicznych (Vajhadin i in. 2022). Ilości środka sieciującego oraz procedura tego procesu nie wpływają na rozmiar syntezowanych struktur. Zwiększenie ilości glutałaledehydu powoduje zmniejszenie liczby grup aminowych na powierzchni nanocząstek HSA, jak również doprowadza do obniżenia potencjału zeta (Weber i in. 2000). Omawiany sposób przygotowania NP posiada wiele zalet, takich jak: nieskomplikowany proces, szybkość reakcji oraz brak konieczności dodawania środków powierzchniowo czynnych. Jest odpowiedni do enkapsulacji różnych leków hydrofobowych. Obecnie jest najczęściej stosowaną metodą. Mimo licznych zalet można przypisać mu również kilka negatywnych aspektów. Jedną z wad jest pozostałość czynnika sieciującego mogącego wywierać toksyczny wpływ na organizm ludzki (Meng i in. 2022; Verma i in. 2018). Ponadto, ze względu na swoje rozmiary, nanostruktury cechują się wysoką energią swobodną. Z tego powodu może dochodzić do ich agregacji oraz aglomeracji. Ich czas biodegradacji jest dość długi, co może wpływać na ogólnoustrojową toksyczność oraz zmniejszyć zdolność do dostosowania odpowiedniej dawki. Ten rodzaj NP może być stosowany w terapii celowanej, do których należą: dostarczenie leków do płuc, terapia przeciwnowotworowa, leczenie guzów oraz szczepionki, w których NP zostają opłaszczane biodegradowalnym polimerem, tworząc mikrosfery (Verma i in. 2018).

Poniższy schemat przedstawia rodzaje zastosowań białkowych nanocząstek (Rys. 1).

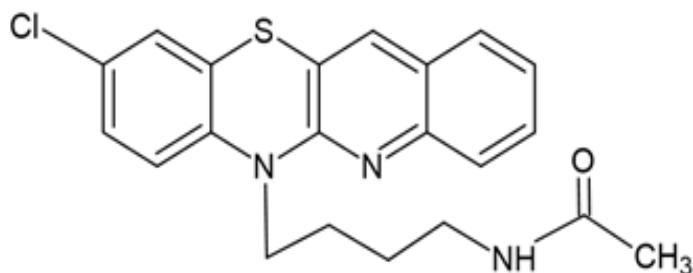


Rys. 1. Zastosowanie proteinowych nanostruktur (Verma i in. 2018; Jachowicz i in. 2009).

* poprzez worek spojówkowy, kanały łzowe, bezpośrednio do gałki ocznej

Rozwój w dziedzinie nanotechnologii może doprowadzić do zwiększenia zastosowań NP w leczeniu różnych chorób, choć ich dotychczasowe wykorzystanie przyniosło już pewne zadawalające wyniki. Udowodniono, że doksorubicyna-polietylenoimina (DOX-PEI) zamknięta w nanostrukturach zbudowanych z HSA daje dobre rezultaty w terapii raka piersi - zaobserwowano mniejszą cytotoksyczność i zwiększoną biokompatybilność preparatu. Metotreksat (MTX), powszechnie stosowany w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów, w połączeniu z HSA doprowadził do spadku proliferacji fibroblastów błony maziowej i ograniczenia degradacji tkanki chrzęstnej. Kolejnym przykładem jest stosowanie **substancji P** (SP) w połączeniu z żelatynowymi nanocząstkami (SP-GNP) w leczeniu choroby Parkinsona. Badania *in vitro* i *in vivo* nad NP pokrytymi 1,2-diacetylo-sn-glicero-3-fosfo-1-seryną dostarczyły informacji o zwiększeniu aktywności przeciwliszczaniowej. Zastosowanie technologii nanocząstek proteinowych podnosi skuteczność w antybiotykoterapii i zmniejsza toksyczność. Ich połączenie gwarantuje wzrost skuteczności lub spadek toksyczności tych leków. Nanocząstki gliadynowe zawierające amoksycylinę (AGNP) wykazały działanie przeciw *Helicobacter pylori*, a wymagana dawka do całkowitej eradykacji była mniejsza w przypadku AGNP niż samego antybiotyku beta-laktamowego. NP białkowe mają zdolność do przekraczania bariery krew-mózg, która często nie może być pokonana przez tradycyjnie stosowany lek podawany drogą dożylną. Przykład tego stanowią loperamid, tubokuraryna i doksorubicyna (Verma i in. 2018). FDA zatwierdził preparat Abraxane jako pierwszy lek w postaci nanocząstek związanych z albuminą. Paklitaksel będący substancją czynną preparatu jest skuteczny w leczeniu nowotworów pierwotnie nieoperacyjnych oraz przed i po leczeniu chirurgicznym. Jego stosowanie jest utrudnione ze względu na silną hydrofobowość i konieczności zastosowania emulgatorów zwiększających rozpuszczalność w wodzie. Produkcja paklitakselu w technologii NAB™ umożliwia eliminację polioksyetylowanego oleju rycynowego i tym samym uniknięcie działań niepożądanych. W praktyce klinicznej stosuje się również Alunex jako środek kontrastowy w echokardiologii oraz Optison do USG u chorych z podejrzaną lub potwierdzoną chorobą serca i naczyń podczas echokardiografii przezklatkowej. Kolejnym przykładem jest ^{99m}Tc-Nanocoll, zarejestrowany również jako: ^{99m}Tc-Albures, ^{99m}Tc-Human Serum Albumin oraz ^{99m}Tc-Microalbumin- wykorzystywany w scyntygrafii szpiku kostnego, limfoscycytoprofii i obrazowaniu węzłów wartowniczych w inwazyjnych nowotworach, wykrywaniu zatorów płucnych i mikrozakrzepów żylnych. Obecnie prowadzone są liczne badania kliniczne nad kolejnymi lekami przeciwnowotworowymi wytwarzanymi w technologii NAB. W drugiej fazie badań znajduje się ABI-008 (Celgene) stosowany u chorych z zaawansowanym oraz przerzutowym rakiem sutka po niepowodzeniu terapii lekami alkilującymi lub antracyklinami. ABI-009 (Celgene) w pierwszej fazie badań klinicznych jest badany pod kątem zastosowania u pacjentów z zaawansowanymi, złośliwymi guzami litymi (rak niedrobnokomórkowy płuc, sutka, jajnika), opornymi na standardową terapię. Przypuszcza się, że lek, występujący pod nazwami ABI-011, NBT 011 lub nab-IDN5405 (Celgene) może być skuteczny w leczeniu chorych z guzami litymi i nowotworami układu chłonnego (Konopska i in. 2018).

Poszukiwania nowych leków zostały przyśpieszone ze względu na rosnącą liczbę zachorowań, a także przeszczepów narządów. Odkrycie klasy leków o lepszym profilu terapeutycznym jest ogromnym wyzwaniem dla naukowców. 6-acetyloaminobutylo-9-chlorochino[3,2-b]benzo[1,4]tiazyna (QBT) należy do grupy fenotiazyn cechujących się wieloma aktywnościami biologicznymi, takimi jak: przeciwhistaminowe, przeciwkaszlowe i przeciwwymiotne. Wykazano również ich działanie przeciwnowotworowe, przeciwbakteryjne i zdolne do zahamowania odpowiedzi immunologicznej, zarówno typu komórkowej jak i humoralnej. Dowiedziono skuteczności terapeutyczną związku QBT w łagodzeniu wrzodziejącego zapalenia jelita grubego indukowanego przez dekstran siarczanu sodu u myszy (Artym i in. 2016; Artym i in. 2020).



Rys. 2. 6-acetyloaminobutyl-9-chlorochino[3,2-b]benzo[1,4]tiazyna (QBT).

2. Materiały i Metody

2.1 Materiały

Albumina surowicy ludzkiej (HSA) (czystość minimum 96%) i dimetylosulfotlenek (DMSO) zostały zakupione od Sigma Aldrich (Steinheim, Niemcy). Etanol został dostarczony przez P. P. H "STANLAB" Sp. z o. o. (Lublin, Polska). Aldehyd glutarowy został zakupiony w firmie Warchem (Warszawa, Polska). Wszystkie odczynniki były klasy analitycznej i zostały użyte bez oczyszczania. 6-acetyloaminobutyl-9-chlorochino[3,2-b]benzo[1,4]tiazyna (QBT) została zsyntetyzowana w Katedrze Chemii Organicznej Wydziału Farmaceutycznego w Sosnowcu Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach.

2.2 Metody

Badania spektroskopowe

Roztwór QBT został przygotowany w DMSO, a następnie rozcieńczony do stężenia 2×10^{-5} [mol L⁻¹]. W celu sprawdzenia właściwości absorpcyjnych i fluorescencyjnych, roztwór został zbadany przy użyciu spektroskopii UV-Vis (JASCO V-760) oraz spektrofluorymetrii (JASCO FP-6500).

Enkapsulacja QBT w nanocząstkach z albuminy

Enkapsulację QBT do nanocząstek albuminy surowicy ludzkiej przeprowadzono metodą desolwatacji z zastosowaniem etanolu oraz aldehydu glutarowego, jako środka sieciującego. QBT dokładnie rozpuszczony w DMSO dodany został do roztworu albuminy, a następnie poddany dalszym procedurom, zgodnie z danymi literaturowymi (C. Weber i in. 2000).

Ilość zamkniętego leku została obliczona poprzez różnicę w ilości leku dodanego a ilości leku niezwiązanego. Wydajność enkapsulacji stanowiła procent zawartości leku związanego względem ilości leku dodanego, zgodnie z poniższym równaniem:

$$EE = \frac{\text{całkowita ilość leku} - \text{ilość leku, która nie uległa związaniu}}{\text{całkowita ilość leku}} \times 100\%$$

3. Wyniki

Widmo absorpcyjne próbki o stężeniu 2×10^{-5} [mol L⁻¹] charakteryzowało się trzema wyraźnymi pikami. W poniższej Tab. 1 przedstawiono wyniki pomiarów.

Tab. 1. Zależność absorbancji A od długości fali λ .

Długość fali λ_{\max} (nm)	Absorbancja
257	0.6819
285	0.4147
376	0.1514

Badania spektrofluorescencji wykazały, że QBT fluoryzuje przy długości fali wzbudzenia w zakresie od 240 do 550 nm. Poniższa tabela (Tab. 2) przedstawia wyniki pomiarów.

Tab. 2. Zależność fluorescencji od długości fali wzbudzenia.

Długość fali wzbudzenia λ_{ex} (nm)	Długość fali emisji (nm)	Wartość fluorescencji
257	464	124.09
285	463	146.89
376	464	109.02

Wydajność enkapsulacji (EE) wyniosła 88%, co wskazuje na możliwość enkapsulacji QBT w nanocząstkach HSA metodą desolwatacji.

4. Dyskusja

Badania nowych związków wykazujących potencjalne działanie przeciwnowotworowe mogą zostać wykonane w różny sposób. Dla przykładu, QBT wykazuje potwierdzone działanie przeciwnowotworowe oraz przeciwbakteryjne, natomiast inne pochodne tiazynowe zostały przebadane pod względem aktywności przeciwnowotworowej i zdolności wiązania się do białek osocza (Czarny i in. 2014; Maciążek-Jurczyk i in. 2021; Owczarzy i in. 2023). W przeprowadzonych przez nas badaniach sprawdzono zdolność do absorbancji oraz fluorescencji QBT, co zostało potwierdzone. Jak do tej pory, podobne badania nie były wykonywane dla grupy związków chino[3,2-b]benzo[1,4]tiazyn.

Użycie nanocząstek w praktyce klinicznej nie jest nową strategią. Amerykański fizyk i laureat Nagrody Nobla Richard Feynman przedstawił koncepcję nanotechnologii już w 1959 roku. Badania nad omawianym systemem dostarczania leków są prowadzone od kilkudziesięciu lat, a o ich postępach można przeczytać w pracy Samer Bayda i in. (Bayda i in. 2019). Guangming Gong i in. (Gong i in. 2015) w przeprowadzonych badaniach wykazali, że albumina surowicy ludzkiej (HSA) jest idealnym nośnikiem leków hydrofobowych. W artykule opisano łatwą drogę do otrzymania nanocząstek albumina-kurkumina (HSA-CCM). Otrzymane nośniki HSA-CCM miały rozmiar około 130 nm, a rozpuszczalność kurkuminy wzrosła ponad 500-krotnie. Otrzymane nanostruktury mogą celować w tkanki nowotworowe i gromadzić się w cytoplazmie tych komórek. Z tego powodu nanocząstki HSA wytworzone przez denaturację z użyciem β -merkaptotetanolu są obiecującymi nanonośnikami zarówno dla chemioterapeutyków, jak i sond obrazujących (Gong i in. 2015).

W 2020 roku Tiantian Hao i in. (Hao i in. 2020) przeprowadzili próbę syntezy nanocząstek HSA z szeregiem pochodnych kurkuminy. Wyniki pokazały, że zastosowanie nanocząstek HSA umożliwia przewyciężenie trudności w stosowaniu niektórych leków. Dla przykładu kurkumina o niskiej rozpuszczalności, stabilności oraz biodostępności, która po związaniu z nanocząstkami HSA przejawia duży potencjał dla niektórych zastosowań spożywczych i farmaceutycznych (Hao i in. 2020).

Ayasha Patel i in. (Patel i in. 2020) udowodnili wysoki potencjał HSA, jako nośnika dopłucznego podawania związków benzotiazynonu (BTZ). Rozpuszczalność substancji została zwiększona od 2 do 140 razy. Wydajność enkapsulacji osiągnęła 37-60%, co znacznie różni się od wartości osiągniętej w przeprowadzonych przez nas badaniach. Fakt może wynikać z różnic w oddziaływaniu albuminy z BTZ oraz QBT. Nośniki HSA-BTZ były stabilne podczas przechowywania przez sześć miesięcy. Preparaty nanocząstek HSA wykazały zwiększoną aktywność przeciwpłatkową leku (Patel i in. 2020). Zarówno przytoczone dane, jak i badania własne sugerują wysoki potencjał albuminowych nanocząstek w terapii.

5. Wnioski

QBT charakteryzowana jest jako substancja posiadająca zdolność pochłaniania promieniowania w zakresie UV-Vis oraz fluorescencji, co jest użytecznym narzędziem do badań ilościowych. Podczas badań udało się otrzymać albuminowe nośniki 6-acetyloaminobutylo-9-

chlorochino[3,2-b]benzo[1,4]tiazyny co sugeruje, że zastosowana metoda preparatyki nanocząstek jest odpowiednia również dla tego leku. Wydajność enkapsulacji (EE) wyniosła 88%, co wskazuje na możliwość enkapsulacji QBT do nanocząstek HSA. Wymagane są dalsze badania, w celu opracowania skutecznej formy tego leku.

6. Podziękowania

Podziękowania dla Pani dr hab. n. farm. Małgorzaty Jeleń, prof. SUM i Pani Prof. dr hab. n. farm. Beaty Morak-Młodawskiej za możliwość wykonania badań z użyciem 6-acetyloaminobutylo-9-chlorochino[3,2-b]benzo[1,4]tiazyny.

Przedstawione badania zostały częściowo sfinansowane z umowy statutowej PCN-2-012/K/2/F, PCN-1-022/K/2/F, PCN-2-030/K/2/F, PCN-2-011/K/2/F (Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach)

7. Literatura

- Artym J i in. (2016) Selected azaphenothiazines inhibit delayed type hypersensitivity and carrageenan reaction in mice. *International Immunopharmacology* 40:265–268.
- Artym J i in. (2020) Therapeutic effects of an azaphenothiazine derivative in mouse experimental colitis. *Histology and Histopathology* 35(7):691–699.
- Bayda S i in. (2019) The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules* 25(1): 112.
- Contera S i in (2020) Biotechnology, nanotechnology and medicine. *Emerging Topics in Life Sciences* 4(6):551–554.
- Czarny A i in. (2014) Antimicrobial Properties of Substituted Quino[3,2 b]benzo[1,4]thiazines. *Polish Journal of Microbiology* 3: 335–339.
- Dreis S i in. (2007) Preparation, characterization and maintenance of drug efficacy of doxorubicin-loaded human serum albumin (HSA) nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 341(1-2):207–214.
- Gong G i in. (2015) Curcumin-incorporated albumin nanoparticles and its tumor image. *IOP Publishing* 26: 045603.
- Hao T i in. (2020) Preparation, characterization, antioxidant evaluation of new curcumin derivatives and effects of forming HSA-bound nanoparticles on the stability and activity. *European Journal of Medicinal Chemistry* 207: 112798.
- Jachowicz R i in. (2009) Mikro- i nanocząstki w terapii okulistycznej. *Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne* 4(65): 285–290.
- Jahanban-Esfahlan A i in. (2016) A simple improved desolvation method for the rapid preparation of albumin nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules* 91:703–709.
- Karimia M i in. (2016) Albumin nanostructures as advanced drug delivery systems. *Expert Opinion on Drug Delivery* 13(11):1609–1623.
- Konopska B i in. (2018) Albumin-based nanosystems in medicine. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 72:1004–1017.
- Maciążek-Jurczyk M i in. (2021) The Influence of Oxidative Stress on Serum Albumin Structure as a Carrier of Selected Diazaphenothiazine with Potential Anticancer Activity. *Pharmaceuticals* 14(3): 285.
- Meng R i in. (2022) Preparation of Drug-Loaded Albumin Nanoparticles and Its Application in Cancer Therapy. *Nanotechnology for Environment and Biomedical Applications. Journal of Nanomaterials*, Article ID 3052175.
- Owczarzy A i in. (2023) Spectroscopic Studies of Quinobenzothiazine Derivative in Terms of the In Vitro Interaction with Selected Human Plasma Proteins: Part 2. *Molecules* 28(2): 698.
- Patel A i in. (2020) In vitro and in vivo antitubercular activity of benzothiazinone-loaded human serum albumin nanocarriers designed for inhalation. *Journal of Controlled Release* 328: 339–349.

- Pérez-Herrero E, Fernández-Medarde A (2015) Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 93:52–79.
- Vajhadin F i in. (2022) Glutaraldehyde crosslinked doxorubicin promotes drug delivery efficiency using cobalt ferrite nanoparticles. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* 220:112870.
- Verma D i in. (2018) Protein Based Nanostructures for Drug Delivery. *Journal of Pharmaceutics* ID 9285854.
- Weber C i in. (2000) Desolvation process and surface characterization of protein nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 94:91–102.

6. Wyznaczanie granicy wykrywalności i oznaczalności drospirenonu metodą TLC z densytometrią

Determination of the limit of detection and quantification of drospirenone by TLC with densitometry

Weronika Starego⁽¹⁾, Małgorzata Dołowy⁽²⁾

⁽¹⁾Koło Naukowe przy Zakładzie Chemii Analitycznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec

⁽²⁾Zakład Chemii Analitycznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec;

Słowa kluczowe: chromatografia cienkowarstwowa, steroidy, drospirenon, LOD, LOQ

Streszczenie

Drospirenon (DROS) to związek steroidowy, zaliczany do grupy progestagenów czwartej generacji. Znajduje on szerokie zastosowanie jako składnik gestagenowy hormonalnych środków antykoncepcyjnych. Preparaty te stosowane są jako środki zapobiegające ciąży, a także jako leki wykorzystywane w hormonalnej terapii zastępczej, w leczeniu zespołu policystycznych jajników oraz w endometriozie. W niniejszej pracy przeprowadzono cykl badań mających na celu opracowanie optymalnych warunków chromatograficznych, które umożliwią szybką i czułą detekcję oraz ilościowe oznaczenie drospirenonu w próbkach prostej metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) w połączeniu z densytometrią. W toku przeprowadzonych badań przetestowano różne płytki chromatograficzne oraz fazy ruchome będące mieszaninami dwu lub trzyskładnikowymi i następnie wyznaczono wartości granicy wykrywalności (LOD) i oznaczalności tj. LOQ drospirenonu. Ponadto określono wpływ stosowanych warunków chromatograficznych na analizę drospirenonu metodą TLC. Stwierdzono, że najlepszymi warunkami do wykrywania drospirenonu metodą TLC są płytki pokryte żelazem krzemionkowym 60F₂₅₄ z fazą koncentracji rozwijanej za pomocą fazy ruchomej złożonej z acetonu oraz wody (30:20, v/v). Układ ten pozwolił na detekcję i ilościowe oznaczenie badanego steroidu na poziomie LOD_{DROS}=0,022 µg i odpowiednio LOQ_{DROS}=0,066 µg w przeliczeniu na plamkę. Opracowane warunki chromatograficzne mogą być w przyszłości przydatne do wykrywania i ilościowego oznaczania drospirenonu w jego prostych preparatach lub próbkach biologicznych.

1. Wstęp

Drospirenon to stosunkowo nowy, syntetyczny związek steroidowy będący pochodną 17α-spirolonaktanu. Zaliczany jest do grupy progestagenów czwartej generacji (Rapkin i Winer 2007). Jego profil farmakologiczny jest bardzo podobny do endogennego progesteronu, z czego wynika jego działanie antymineralokortykosteroidowe i antyandrogenowe. Ponadto wykazuje on właściwości progestagenne, antyestrogenowe i antygonadotropowe (Szlendak-Sauer, Radowicki, Skórzewska 2009; Krattenmacher 2000). W praktyce klinicznej drospirenon stosowany jest jako składnik hormonalnych estrogenowo-gestagenowych środków antykoncepcyjnych. Preparaty te stanowią skuteczną oraz odwracalną metodę zapobiegania ciąży (Dworacka, Strzemałczyk, Domagała 2017). Dodatkowo, drospirenon wchodzący w skład dwuskładnikowych środków antykoncepcyjnych znalazł zastosowanie w terapii kobiet cierpiących na endometriozę, zespół policystycznych jajników oraz w hormonalnej terapii zastępczej. Dostępne publikacje naukowe prezentują przede wszystkim metody analityczne opracowane w celu jakościowego i ilościowego oznaczania drospirenonu w próbkach złożonych tj. w obecności innego steroidu np. etynyloestradiolu czy odpowiednio 17β-estradiolu. Technika analityczną stosowaną w tym celu jest wysokosprawną chromatografią cieczą (HPLC) z wykorzystaniem różnych faz stacjonarnych i ruchomych, co umożliwia osiągnięcie granicy wykrywalności i oznaczalności drospirenonu na poziomie od kilku µg ml⁻¹ do kilku ppm (Aydoğmuş i in. 2015; Saliva Benevenuti i in. 2013; Praveen, Ranganath, Dibakar 2013; Singh i in. 2013). Brak

jest natomiast obszernych danych dotyczących warunków analizy drospirenonu w próbkach prostych z zastosowaniem łatwej w użyciu i ekonomicznej metody jaką jest chromatografia cienkowarstwowa. W jednej z prac autorstwa Bhusari oraz Dhaneshwar opublikowanej w 2012 roku opracowano warunki przeznaczone do równoczesnego oznaczania drospirenonu i etynyloestradiolu w postaci substancji czystych oraz tabletek. W pracy tej wykorzystano płytki pokryte żelom krzemionkowym 60F₂₅₄ oraz jako fazę ruchomą mieszaninę złożoną z toluenu, metanolu i amoniaku w stosunku objętościowym 8:2:0,1. Natomiast do detekcji obu związków użyto densytometru (Desaga 60, Niemcy). Skanowanie densytometryczne chromatogramów przeprowadzono przy długości fali $\lambda=280$ nm. Liniowość ww. metody TLC wskazała na możliwość oznaczania przy jej użyciu drospirenonu obok etynyloestradiolu w zakresie 30–80 ng drospirenonu w przeliczeniu na plamkę (Bhusari, Dhaneshwar 2012).

Celem niniejszej pracy było opracowanie optymalnych warunków chromatograficznych do wykrywania i ilościowego oznaczania drospirenonu w próbce prostej za pomocą TLC w połączeniu z densytometrią. W pracy przetestowano układy chromatograficzne złożone z różnych płytek chromatograficznych oraz faz ruchomych i wyznaczono dla każdego z nich wartości LOD i LOQ drospirenonu. Ponadto dokonano oceny wpływu zastosowanych warunków tj. danej fazy stacjonarnej i ruchomej na te dwa parametry.

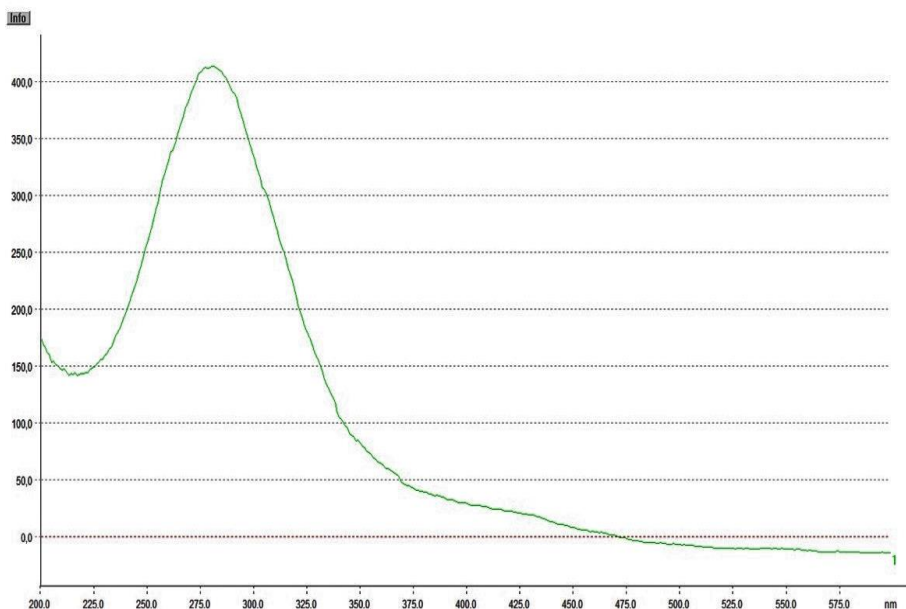
2. Materiał i metody

W badaniach wykorzystano wzorec analizowanej substancji tj. drospirenonu o czystości $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, Chiny) z którego następnie sporządzono roztwór drospirenonu o określonym stężeniu w metanolu. W pracy wykorzystano płytki chromatograficzne pokryte żelom krzemionkowym 60F₂₅₄ z fazą zateżenia, płytki pokryte mieszaniną żelu krzemionkowego 60 i ziemi okrzemkowej F₂₅₄, płytki pokryte żelom krzemionkowym 60F₂₅₄ bez fazy koncentracji, a także oraz płytki do chromatografii w odwróconym układzie faz pokryte żelom: RP18F₂₅₄, RP18WF₂₅₄ i RP8F₂₅₄ (E. Merck, Niemcy). Jako składniki faz ruchomych użyto wodę redetylowaną wyprodukowaną w Zakładzie Chemii Analitycznej Wydziału Nauk Farmaceutycznych SUM w Sosnowcu oraz następujące rozpuszczalniki organiczne o czystości do HPLC: acetonitryl, metanol, aceton i lodowaty kwas octowy. Producentem ww. rozpuszczalników była firma Avantor (Gliwice, Polska).

W ramach wstępnych badań przeprowadzono liczne eksperymenty chromatograficzne, które miały na celu dokonanie wyboru najkorzystniejszych tj. optymalnych warunków chromatograficznych do analizy badanego drospirenonu tj. rodzaju płytek chromatograficznych oraz określonej fazy ruchomej spośród mieszanin rozpuszczalników organicznych tworzących różne fazy ruchome, takich jak: acetonitryl + metanol + woda (15:10:25; v/v/v); aceton + woda (30:20); acetonitryl + woda + lodowaty kwas octowy (20:27:3; v/v/v); metanol + woda (35:15; v/v); acetonitryl + woda (36:14; v/v) i acetonitryl + woda (40:10; v/v). Tak przygotowane fazy ruchome w ilości 50 ml umieszczano w szklanych komorach chromatograficznych na okres 15 minut do momentu ich wysycenia oparami rozpuszczalników. Następnie nanoszono punktowo mikropipetą na płytki chromatograficzne o wymiarach 10x10 cm lub 10x20 cm w trzech powtórzeniach metanolowy roztwór drospirenonu o określonym stężeniu w ilości 5 μ l. Płytki rozwijano każdorazowo na wysokość 7 cm, po czym po wysuszeniu płytek w temperaturze pokojowej przez 24 h dokonywano analizy kształtu plamek drospirenonu pod lampą UV (Camag, Szwajcaria) oraz wyznaczano współczynnik opóźnienia badanego związku tj. R_{fDROS} . Wartość R_{fDROS} posłużyła do wyboru optymalnych faz stacjonarnych oraz faz ruchomych do dalszej analizy ilościowej tego steroidu. Za najbardziej korzystne układy chromatograficzne uznano te warunki chromatograficzne, które pozwoliły otrzymać symetryczne i zwarte plamki drospirenonu o współczynniku opóźnienia w zakresie $0,3 \leq R_{fDROS} < 0,9$.

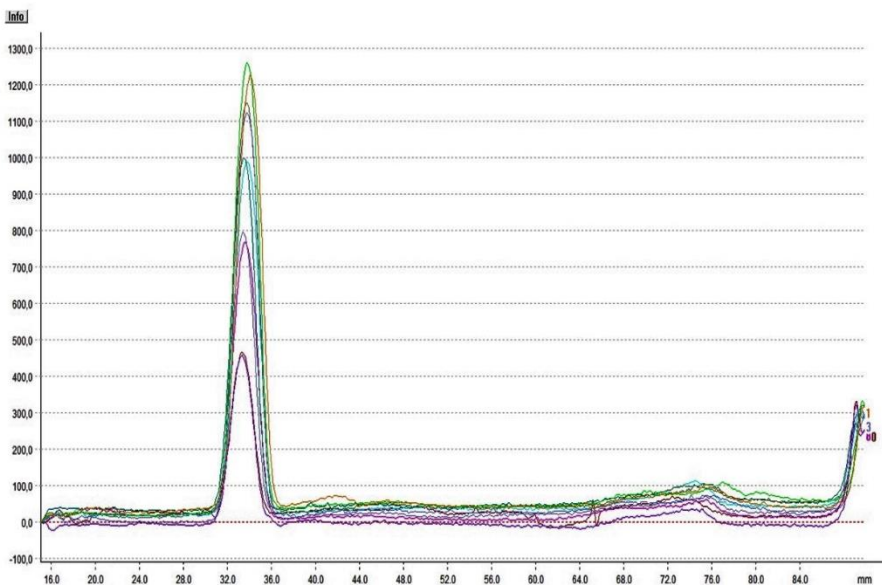
W dalszych etapach badań analizując densytometrycznie naniesione w postaci plamek roztwory wzorcowe DROS w zakresie stężeń tego związku od 5 μ g DROS do 1 μ g na plamkę, wyznaczono wartości granicy wykrywalności drospirenonu (LOD_{DROS}) i oznaczalności (LOQ_{DROS}) w danych warunkach chromatograficznych. W tym celu odpowiednio przygotowane, metanolowe roztwory badanego związku nanoszono punktowo w ilości 5 μ l na płytki chromatograficzne w trzech

powtórzeniach. Po rozwinięciu chromatogramów w danej fazie ruchomej dokonywano pomiaru powierzchni plamek drospirenonu otrzymanych za pomocą densytometru przy długości fali równej $\lambda=280$ nm. Na Rys. 1 zaprezentowano przykładowy spektrodensytogram badanego związku wykonany w zakresie 200-600 nm, który potwierdza maksimum absorpcji promieniowania UV drospirenonu przypadające na wartość $\lambda=280$ nm.



Rys. 1. Spektrodensytogram drospirenonu.

Z kolei na Rys. 2 przedstawiono przykładowy chromatogram drospirenonu uzyskany na drodze skanowania densytometrycznego plamek DROS otrzymanych na podstawie serii naniesionych na płytkę roztworów analizowanego związku w badanym zakresie stężeń.



Rys. 2. Przykładowy densytogram badanego drospirenonu.

W wyniku skanowania densytometrycznego uzyskano wartości powierzchni plamek drospirenonu (A_{UDROS}) odpowiadające jego określonej zawartości (x_{DROS}) w mikrogramach na plamkę. Dane te wykorzystano dalej do sporządzenia krzywych kalibracyjnych w postaci liniowej zależności: $A_{UDROS} = A \times x_{DROS} + B$, gdzie A i B to współczynniki uzyskanej krzywej. Wartość współczynnika kierunkowego ww. krzywej kalibracji (A) oraz odpowiednio wartość odchylenia standardowego krzywej kalibracji (SE) i wartość odchylenia wyrazu wolnego krzywej kalibracji (S_B) posłużyły do obliczenia wartości granicy wykrywalności (LOD_{DROS}), w oparciu o wzory: $LOD_{1DROS} = SE \times 3,3 \times A^{-1}$ i $LOD_{2DROS} = S_B \times 3,3 \times A^{-1}$ oraz granicy oznaczalności (LOQ_{DROS}), które oszacowano wg kolejnych wzorów: $LOQ_{1DROS} = SE \times 10 \times A^{-1}$ i $LOQ_{2DROS} = S_B \times 10 \times A^{-1}$. Wartości obliczonych tymi dwoma sposobami parametrów będących miarą granicy wykrywalności i oznaczalności badanego steroidu za pomocą TLC połączonej z densytometrią jako LOD_1 (LOD_2) oraz LOQ_1 (LOQ_2) następnie uśredniano, w celu wyznaczenia miarodajnej wartości wyznaczanych parametrów.

3. Wyniki i dyskusja

Badany w niniejszej pracy drospirenon to przedstawiciel grupy steroidów, który jak wynika z wykonanego przeglądu literaturowego oznaczano dotychczas w złożonych próbkach farmaceutycznych i biologicznych przede wszystkim metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w obecności takich związków jak 17β -estradiol lub odpowiednio etynyloestradiol (Aydoğmuş i in. 2015; Saliva Benevenuti i in. 2013; Praveen, Ranganath, Dibakar 2013; Singh i in. 2013). Natomiast praca opublikowana z zakresu metody TLC przez Bhusarii i Dhaneshwar w czasopiśmie *Reviews in Analytical Chemistry* przedstawia metodę TLC przeznaczoną do oznaczania drospirenonu i etynyloestradiolu w postaci substancji czystej oraz w preparacie farmaceutycznym o nazwie Yasmin (Bhusarii, Dhaneshwar 2012). Jako fazę ruchomą wykorzystano w tych badaniach toluen + metanol + amoniak (8:2:1, v/v/v) oraz płytki pokryte żelem krzemionkowym 60F₂₅₄. Liniowość tej metody mieściła się w zakresie 30-80 ng na plamkę DROS. Wartość $R_{fDROS} = 0,42$, a granice wykrywalności i oznaczalności przyjmowały wartości $LOD_{DROS} = 10$ ng na plamkę, a $LOQ_{DROS} = 20$ ng na plamkę. W związku z brakiem w literaturze metody TLC przeznaczonej do analizy drospirenonu w próbce prostej tj. bez obecności dodatkowych substancji jak ww. etynyloestradiol, w ramach niniejszych badań postanowiono opracować korzystne warunki chromatograficzne umożliwiające analizę tego związku tj. jego wykrywanie i oznaczanie ilościowe w próbce prostej. W związku z tym, w pierwszym etapie pracy przebadano różnorodne fazy ruchome i stacjonarne pokryte żelem krzemionkowym. Badania wstępne drospirenonu posłużyły do wyboru najbardziej korzystnych warunków chromatograficznych do identyfikacji tj. wykrywania i następnie ilościowego oznaczania tego związku za pomocą techniki TLC w połączeniu z densytometrią przy $\lambda = 280$ nm. Uzyskane na drodze analiz przeprowadzonych w trakcie badań wstępnych chromatogramy DROS świadczą o tym, że rekomendowanymi do analizy ilościowej drospirenonu warunkami są: faza ruchoma złożona z acetonitrylu + metanol + kwas octowy (20:27:3; v/v/v) oraz płytki pokryte: żelem krzemionkowym 60F₂₅₄ bez fazy zateżnienia i z fazą koncentracji, płytki pokryte mieszaniną żelu krzemionkowego 60 i ziemi okrzemkowej F₂₅₄ oraz pokryte żelem RP18F₂₅₄; faza ruchoma złożona z rozpuszczalników: acetonitryl + metanol + woda (15:10:25; v/v/v) oraz płytki pokryte żelem krzemionkowym 60F₂₅₄ bez fazy oraz z fazą koncentracji i mieszaniną żelu krzemionkowego 60 oraz ziemi okrzemkowej F₂₅₄; faza ruchoma aceton + woda (30:20; v/v) oraz płytki pokryte: żelem krzemionkowym 60F₂₅₄ bez fazy koncentracji, płytki pokryte mieszaniną żelu krzemionkowego 60 i ziemi okrzemkowej F₂₅₄ oraz płytki powleczone żelem RP18F₂₅₄; faza ruchoma: acetonitryl + woda (36:14; v/v) oraz płytki pokryte fazą RP18F₂₅₄, żelem RP8F₂₅₄ oraz RP18WF₂₅₄; faza ruchoma metanol + woda (35:15; v/v) oraz płytki pokryte: żelem RP18F₂₅₄, żelem RP8 F₂₅₄ oraz RP18WF₂₅₄. Podczas badań wstępnych zaobserwowano, że w przypadku układów chromatograficznych stosowanych w normalnym układzie faz (NP-TLC) najlepsze rezultaty tzn. symetryczne plamki DROS i optymalną wartość współczynnika opóźnienia DROS tj. R_{fDROS} otrzymano za pomocą mieszaniny, w skład której wchodził jako główny komponent acetonitryl. Dodatek kolejnych rozpuszczalników np. metanolu czy lodowatego kwasu octowego w odpowiedniej objętości nieznacznie tylko wpłynął na zmianę wartości R_{fDROS} , które w układach

chromatograficznych do adsorpcyjnej TLC (NP-TLC) były jednak w większości przebadanych przypadków bardzo wysokie tj. bliskie 0,9 lub powyżej tej wartości. Stąd też w dalszym etapie prowadzonych badań przetestowano układy złożone z płytek chromatograficznych i faz ruchomych typowych dla TLC w odwróconym układzie faz (RP-TLC) tj. płytek pokrytych żelom RP18F₂₅₄, RP18WF₂₅₄ i RP8F₂₅₄ w połączeniu z dwuskładnikowymi mieszaninami złożonymi z rozpuszczalników takich jak metanol + woda czy acetonitryl + woda jako fazami ruchomymi. Warunki te okazały się być efektywniejszymi w odniesieniu do adsorpcyjnej TLC. Dzięki nim plamki DROS tworzyły zwarte pasma i nie smugowały. Ponadto wartości R_{fDROS} były znacznie niższe tzn. mniejsze niż 0,9. W związku z tym dalsze badania ilościowe DROS oparto na tych również układach chromatograficznych dedykowanych do chromatografii w odwróconym układzie faz.

Wyznaczone na podstawie densytogramów drospirenonu uzyskanych dla optymalnych warunków chromatograficznych wartości granicy wykrywalności i oznaczalności w oparciu o dwie formuły uwzględniające w obliczeniach wartości błędu standardowego danej korelacji liniowej (SE) i odpowiednio odchylenia standardowego jej wyrazu wolnego (S_B) i uzyskaną na ich podstawie wartość średnią (LOD_{DROS} i LOQ_{DROS}) dla każdego badanego układu chromatograficznego prezentują Tab. 1 i 2.

Tab. 1. Wartości granicy wykrywalności drospirenonu (LOD_{DROS}) w μg na plamkę.

Skład stosowanej fazy ruchomej	Faza stacjonarna stosowana w postaci płytek chromatograficznych w normalnym układzie faz (NP-TLC)	LOD_{1DROS}	LOD_{2DROS}	Średnia wartość LOD_{DROS}
Faza I acetonitryl+metanol+woda (15:10:25; v/v/v)	żel krzemionkowy 60F ₂₅₄ z fazą koncentracji	0,112	0,158	0,135
	mieszanina żelu krzemionkowego 60 i ziemi okrzemkowej F ₂₅₄	0,248	0,544	0,396
	żel krzemionkowy 60F ₂₅₄ bez fazy koncentracji	0,077	0,168	0,122
	żel krzemionkowy RP18F ₂₅₄	0,199	0,437	0,318
Faza II aceton+woda (30:20; v/v)	żel krzemionkowy 60F ₂₅₄ z fazą koncentracji	0,014	0,030	0,022
	mieszanina żelu krzemionkowego 60 i ziemi okrzemkowej F ₂₅₄	0,126	0,193	0,160
	żel krzemionkowy 60F ₂₅₄ bez fazy koncentracji	0,243	0,370	0,306
	żel krzemionkowy RP18F ₂₅₄	0,098	0,216	0,157
Faza III acetonitryl+woda+ lodowaty kwas octowy (20:27:3; v/v/v)	żel krzemionkowy 60F ₂₅₄ z fazą koncentracji	0,086	0,250	0,168
	mieszanina żelu krzemionkowego 60 i ziemi okrzemkowej F ₂₅₄	0,136	0,394	0,265
	żel krzemionkowy 60F ₂₅₄ bez fazy koncentracji	0,034	0,052	0,043
	żel krzemionkowy RP18F ₂₅₄	0,199	0,438	0,318
Skład stosowanej fazy ruchomej	Faza stacjonarna stosowana w postaci płytek chromatograficznych w odwróconym układzie faz (RP-TLC)	LOD_{1DROS}	LOD_{2DROS}	Średnia wartość LOD_{DROS}

Faza IV metanol+woda (35:15; v/v)	żel krzemionkowy RP18F ₂₅₄	0,156	0,343	0,250
	żel krzemionkowy RP18WF ₂₅₄	0,184	0,281	0,232
	żel krzemionkowy RP8F ₂₅₄	0,027	0,052	0,040
Faza V acetonitryl+woda (36:14; v/v)	żel krzemionkowy RP18F ₂₅₄	0,208	0,291	0,250
	żel krzemionkowy RP18WF ₂₅₄	0,274	0,791	0,532
	żel krzemionkowy RP8F ₂₅₄	0,316	0,696	0,506

Tab. 2. Wartości granicy oznaczalności drospirenonu (LOQ_{DROS}) w µg na płamkę.

. Skład stosowanej fazy ruchomej	Faza stacjonarna stosowana w postaci płytek chromatograficznych w normalnym układzie faz (NP-TLC)	LOQ_{1DROS}	LOQ_{2DROS}	Średnia wartość LOQ_{DROS}
Faza I acetonitryl+meta nol+woda (15:10:25; v/v/v)	żel krzemionkowy 60F ₂₅₄ z fazą koncentracji	0,340	0,480	0,410
	mieszanina żelu krzemionkowego 60 i ziemi okrzemkowej F ₂₅₄	0,750	1,650	1,200
	żel krzemionkowy 60F ₂₅₄ bez fazy koncentracji	0,232	0,510	0,371
	żel krzemionkowy RP18F ₂₅₄	0,603	1,326	0,964
Faza II aceton+woda (30:20; v/v)	żel krzemionkowy 60F ₂₅₄ z fazą koncentracji	0,041	0,091	0,066
	mieszanina żelu krzemionkowego 60 i ziemi okrzemkowej F ₂₅₄	0,383	0,584	0,484
	żel krzemionkowy 60F ₂₅₄ bez fazy koncentracji	0,734	1,120	0,927
	żel krzemionkowy RP18F ₂₅₄	0,297	0,653	0,475
Faza III acetonitryl+woda + lodowaty kwas octowy (20:27:3; v/v/v)	żel krzemionkowy 60F ₂₅₄ z fazą koncentracji	0,262	0,756	0,509
	mieszanina żelu krzemionkowego 60 i ziemi okrzemkowej F ₂₅₄	0,413	1,193	0,803
	żel krzemionkowy 60F ₂₅₄ bez fazy koncentracji	0,104	0,158	0,131
	żel krzemionkowy RP18F ₂₅₄	0,603	1,326	0,964
Skład stosowanej fazy ruchomej	Faza stacjonarna stosowana w postaci płytek chromatograficznych w odwróconym układzie faz (RP-TLC)	LOQ_{1DROS}	LOQ_{2DROS}	Średnia wartość LOQ_{DROS}
Faza IV metanol+woda (35:15; v/v)	żel krzemionkowy RP18F ₂₅₄	0,472	1,039	0,756
	żel krzemionkowy RP18WF ₂₅₄	0,557	0,851	0,704
	żel krzemionkowy RP8F ₂₅₄	0,081	0,157	0,119
Faza V acetonitryl+woda (36:14; v/v)	żel krzemionkowy RP18F ₂₅₄	0,629	0,882	0,756
	żel krzemionkowy RP18WF ₂₅₄	0,830	2,397	1,614
	żel krzemionkowy RP8F ₂₅₄	0,959	2,108	1,534

Analiza zaprezentowanych w Tab. I wyników LOD_{DROS} czyli średniej wartości granicy wykrywalności DROS uzyskanej za pomocą faz ruchomych I-III w normalnym układzie faz (NP-TLC) wskazuje na to, że parametr ten mieści się w zakresie: 0,022-0,396 μg DROS na płamkę. Najniższą wartość LOD_{DROS} uzyskano za pomocą płytek pokrytych żelem krzemionkowym 60F₂₅₄ z fazą koncentracji i fazy ruchomej II złożonej z acetonu i wody (30:20, v/v). Korzystnymi warunkami do detekcji badanego DROS są również inne układy chromatograficzne składające się z płytek pokrytych żelem krzemionkowym 60F₂₅₄ bez fazy koncentracji oraz z fazy ruchomej III (acetonitryl + woda + lodowaty kwas octowy, 20:27:3, v/v/v). W tym przypadku uzyskuje się $LOD_{DROS}=0,043$ μg DROS na płamkę. Zbliżoną do tego wartość LOD_{DROS} otrzymano także w układzie RP-TLC (odwróconych faz) tj. za pomocą płytek żelowych RP8F₂₅₄ rozwijanych za pomocą fazy ruchomej: metanol+woda (35:15; v/v). Dodatkowo zaobserwowano, że za pomocą tych samych płytek tzn. RP18F₂₅₄ i fazy ruchomej oznaczonej w Tab. I i II jako faza IV oraz V uzyskano identyczne wartości $LOD_{DROS}=0,250$ μg DROS na płamkę, które są bardzo zbliżone do wyniku LOD_{DROS} otrzymanego za pomocą płytek RP18WF₂₅₄ i fazy ruchomej IV ($LOD_{DROS}=0,232$ μg DROS na płamkę). Dane LOQ_{DROS} zestawione w Tab. II czyli średnie wartości granicy oznaczalności badanego drospirenonu prezentują się podobnie jak wcześniej omówione rezultaty granicy wykrywalności - LOD_{DROS} . Wynika to m.in. z faktu, że szacowanie wartości LOQ odbywa się w podobny sposób tj. za pomocą zbliżonej formuły do obliczania LOD , a ponadto $LOQ=3\times LOD$. Analizując otrzymane wartości LOQ_{DROS} można stwierdzić, że za pomocą chromatografii cienkowarstwowej w normalnym układzie faz ilościowo można oznaczyć badany DROS w zakresie: 0,066-1,200 μg DROS na płamkę. Natomiast drugi system chromatograficzny tzn. do chromatografii faz odwróconych pozwala oznaczyć DROS na poziomie od 0,119-1,614 μg DROS na płamkę, co oznacza, że jest on nieznacznie tylko mniej czuły od pierwszego do oznaczania DROS. Opublikowana wcześniej przez Bhusari i Dhaneshwar metoda TLC do oznaczania drospirenonu i etynyloestradiolu w postaci substancji czystej, a także w preparacie farmaceutycznym o nazwie Yasmin umożliwia uzyskanie granicy wykrywalności i oznaczalności drospirenonu na poziomie $LOD_{DROS}=10$ ng na płamkę, a $LOQ_{DROS}=20$ ng na płamkę (Bhusarii i Dhaneshwar 2012). Porównanie otrzymanych w niniejszej pracy wartości LOD_{DROS} i LOQ_{DROS} z rezultatami uzyskanymi przez Bhusarii i Dhaneshwar za pomocą płytek pokrytych żelem krzemionkowym 60F₂₅₄ i fazy ruchomej złożonej z toluenu, metanolu i amoniaku zmieszanych w stosunku objętościowym 8:2:1 (v/v/v) w próbkach złożonych tj. w preparacie w postaci tabletek stanowiącym mieszaninę drospirenonu z etynyloestradiolem wskazuje na to, że wśród licznie przetestowanych w obecnej pracy warunków chromatograficznych najbardziej zbliżone do tych opisanych w cytowanej publikacji i najkorzystniejszymi, bo świadczącymi o największej czułości nowo opracowanej metody TLC są wartości $LOD_{DROS}=0,022$ i odpowiednio $LOQ_{DROS}=0,066$ μg DROS na płamkę. Wynika z tego, że płytki pokryte żelem krzemionkowym 60F₂₅₄ z fazą koncentracji oraz faza ruchoma składająca się z acetonu i wody (30:20, v/v) są najlepszymi warunkami pozwalającymi wykryć i oznaczyć tę najmniejszą ilość badanego drospirenonu w postaci próbki prostej. Zaletą nowo opracowanej procedury do ilościowego oznaczania drospirenonu w próbkach prostych jest jej nie tylko prostota użycia, szybkość, ale też ekologiczność biorąc pod uwagę skład proponowanej fazy ruchomej. W związku z tym może ona być z powodzeniem stosowana jako metoda alternatywna do kontroli jakości drospirenonu w jego prostych próbkach.

4. Wnioski

Uzyskane rezultaty potwierdziły wpływ warunków chromatograficznych na analizę drospirenonu jako substancji czystej lub odpowiednio składnika preparatów prostych. Na podstawie licznie przeprowadzonych badań chromatograficznych drospirenonu z wykorzystaniem różnorodnych układów chromatograficznych, w skład których wchodziły różne fazy ruchome i płytkich chromatograficzne oraz analizy otrzymanych wartości granicy wykrywalności (LOD_{DROS}) i oznaczalności (LOQ_{DROS}) jako parametrów wpływających na czułość nowo opracowanej metody TLC można stwierdzić, że najbardziej korzystnymi warunkami do detekcji i ilościowego oznaczania drospirenonu są płytki pokryte żelem krzemionkowym z fazą zateżania oraz faza ruchoma składająca

się z acetonu i wody (30:20; v/v). Taki układ chromatograficzny pozwala wykryć i oznaczyć badany steroid metodą TLC w połączeniu z densytometrią na poziomie $LOD_{DROS}=0,022$ i odpowiednio $LOQ_{DROS}=0,066$ μg DROS na plamkę. Zaobserwowano, że w normalnym układzie faz można ilościowo oznaczyć badany DROS w zakresie 0,066-1,200 μg DROS na plamkę. Natomiast proponowane w niniejszej pracy układy do chromatografii cienkowarstwowej w odwróconym układzie faz pozwalają oznaczyć DROS na poziomie 0,119-1,614 μg DROS w przeliczeniu na plamkę. Zaprezentowane w tej publikacji warunki chromatograficzne mogą znaleźć zastosowanie do czułego wykrywania i ilościowego oznaczania drospirenonu w preparatach prostych lub odpowiednio próbkach biologicznych. Planowana w przyszłości kontynuacja niniejszych badań dotyczyć będzie opracowania nowych sposobów detekcji drospirenonu z użyciem nowych, nieopisanych dotąd w literaturze odczynników wywołujących i ocena ich wpływu na jego wykrywalność i oznaczalność.

5. Podziękowanie

Praca została sfinansowana przez Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, umowa nr PCN-1-009/N/2/F.

6. Literatura

- Aydoğmuş Z, Yılmaz EM, Yörüşün S, Akpınar S (2015) Development of simultaneous derivative spectrophotometric and HPLC methods for determination of 17-beta-estradiol and drospirenone in combined dosage form. *International Scholarly Research Notices*: 2015:534065, DOI: 10.1155/2015/534065. eCollection 2015.
- Bhusari VK, Dhaneshwar S (2012) Validated HPTLC method for simultaneous estimation of ethinyl estradiol and drospirenone in bulk drug and formulation. *Reviews in Analytical Chemistry* 31(2): 123-129.
- Dworacka M, Stelmaszyk A, Domagała J (2017) Znaczenie składu hormonalnych środków antykoncepcyjnych dla ich skuteczności i tolerancji. *Forum Medycyny Rodzinnej* 3: 121-128.
- Krattenmacher R (2000) Drospirenone: pharmacology and pharmacokinetics of a unique progestogen. *Contraception* 62(1): 29-38.
- Praveen C, Ranganath MK, Divakar P (2013) Method development and validation for simultaneous estimation of ethinyl estradiol and drospirenone and forced degradation behavior by HPLC in combined dosage form. *Pharmaceutica Analytica Acta* 4(5), DOI: 10.4172/2153-2435.1000231.
- Rapkin AJ, Winer SA (2007) Drospirenone: a novel progestin. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 8(7): 989-999.
- Saliva Benevenuti V, Garona Galdos AA, Alves Mothe CM, Bacchi Pallastrelli M, Prado MSA, Singh AK, Kedor-Hackmann ERM, Miritello Santoro MIR (2013) Simultaneous determination of ethinyl estradiol and drospirenone in oral contraceptive by high performance liquid chromatography. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 49(3): 521-528.
- Singh A, Mishra B, Sharma N, Mishra K (2014) Analytical method development and validation for simultaneous estimation of ethinyl estradiol and drospirenone by HPLC in combined dosage form. *International Journal of Chemical and Pharmaceutical Analysis* 1(3): 80-88.
- Szlendak-Sauer K, Radowicki S, Skórzewska K (2009) Wpływ stosowania nowej, niskoestrogenowej tabletki antykoncepcyjnej zawierającej drospirenon na profil lipidowy, gospodarkę węglowodanową i czynność wątroby. *Ginekologia Polska* 80: 99-102.

7. Identyfikacja zmian konformacyjnych glikowanej albuminy w obecności kwasów tłuszczowych metodą II pochodnej widma absorpcyjnego i fluorescencyjnego

Identification of conformational changes in glycated albumin in the presence of fatty acids using the second derivative of absorption and fluorescence spectra method

Szkudlarek Agnieszka

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

Szkudlarek Agnieszka: aszkudlarek@sum.edu.pl

Słowa kluczowe: glikowana albumina surowicy krwi ludzkiej; kwasy tłuszczowe; metoda II pochodnej widma; spektrofotometria i spektrofluorymetria

Streszczenie

Widma elektronowe i fluorescencyjne białek charakteryzują się dużym wzajemnym podobieństwem. Fakt ten powoduje konieczność użycia w analizie tej grupy związków pochodnych widm, czyli przedstawienia w formie graficznej wartości różniczki widma podstawowego (widma zerowego rzędu) względem długości fali bądź liczby falowej. Wykreślenie pochodnych widm pozwala na uwidocznienie niewielkich różnic spowodowanych m.in. zmianami strukturalnymi. Dla zilustrowania subtelných zmian zachodzących w III-rzędowej strukturze glikowanej albuminy surowicy krwi wywołanych obecnością kwasów tłuszczowych (KT), dla widm absorpcyjnych i emisyjnych glikowanej, bez (gHSA_{af}) i w obecności KT (gHSA) wykreślono drugą pochodną przy użyciu algorytmu Savitzkiego-Golaya. Kwasy tłuszczowe indukują modyfikacje konformacyjne glikowanej albuminy oraz intensyfikują proces glikacji, a analiza drugich pochodnych widm elektronowych wskazuje największe zmiany strukturalne w obrębie występowania reszt fenyloalaninyowych (Phe). Umiejscowienie reszt Phe w każdej z VI subdomen makrocząsteczki sugeruje, iż modyfikacje strukturalne wywołane glikacją albuminy w obecności KT dotyczą całej cząsteczki albuminy, a nie tylko jej wyróżnionego fragmentu. Przeprowadzona analiza drugich pochodnych widm emisyjnych wykazała nieznaczny wzrost hydrofobowości w środowisku występowania reszt Tyr, a znaczny wzrost hydrofilowości okolicy reszty Trp-214 albuminy gHSA. Zmiany

w środowisku występowania reszty Trp-214 i reszt Tyr rozlokowanych m.in. w pobliżu I (subdomena IIA) i II (subdomena IIIA) miejsca wiązania według Sudlowa, spowodowane obecnością KT w cząsteczce glikowanej albuminy, mogą istotnie wpływać na stężenie wolnej frakcji leków stosowanych w terapii cukrzycy. Stąd istotne może okazać się monitorowanie ilości kwasów tłuszczowych dostarczanych wraz z dietą i/lub suplementacją bądź indywidualne dostosowywanie dawek leków, które wiążą się do albuminy.

1. Wstęp

Spektroskopia pochodnej jest metodą, która wykazuje większą czułość i selektywność w porównaniu do klasycznej spektroskopii, ponieważ wartość pochodnej jest determinowana nie tylko od wartości absorbancji, lecz również od kształtu widma podstawowego. Podczas różniczkowania widma zerowego rzędu, pasma nakładające się w widmie podstawowym, ulegają rozdzielaniu na wykresie pochodnej (Kuś i in. 1996).

W odniesieniu do białek, druga pochodna widma eliminuje efekt pochodzący z rozproszenia światła, gdyż widmo UV białka stanowi sumę absorpcji fizycznej i rozproszenia światła. Dodatkowo, skutecznie eliminuje spektralny udział wiązań disiarczkowych. Druga pochodna widma pozwala rozróżnić poszczególne chromofory albuminy. Zakres długości fali 245–270nm drugiej pochodnej

widma makrocząsteczki odpowiada resztom fenyloalaninylowym (Phe), w przedziale długości fal 270–310nm druga pochodna widma Phe wynosi zero. Druga pochodna widma reszt tyrozylowych (Tyr) i reszty tryptofanowej (Trp-214) w zakresie długości fali 240–270nm jest płaska, ale nie jest zerowa. W zakresie od 270nm do 310nm druga pochodna widma białka pochodzi od reszt Tyr i reszty Trp-214. Pik drugiej pochodnej widma, który pochodzi jedynie od reszty Trp-214, odpowiada falom o długościach powyżej 290nm (Levine i Federici 1982). Reszty aminokwasowe o charakterze aromatycznym wykazują znaczne różnice w wartościach molowych współczynników absorpcji: $(\text{Phe})_{\epsilon_{248}} = 110.6 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $(\text{Tyr})_{\epsilon_{276}} = 1330 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $(\text{Trp})_{\epsilon_{281}} = 5620 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Mihalyi 1968), stąd udział poszczególnych reszt w ogólnej absorbancji albuminy nie jest możliwy do określenia na podstawie widma zerowego rzędu.

W prezentowanej pracy, dzięki zastosowaniu metody II pochodnej widma absorpcyjnego i emisyjnego, określono wpływ kwasów tłuszczowych (KT) na proces glikacji oraz na zmiany konformacyjne glikowanej albuminy surowicy krwi ludzkiej, która symuluje stan cukrzycy w organizmie. Każda zmiana konformacyjna zachodząca w strukturze białek spowodowana różnymi patologiami wzbogaca wiedzę dotyczącą prawidłowości funkcjonowania żywych organizmów i jest niezbędna do opracowania skuteczniejszych strategii leczenia.

2. Materiał i metody

W badaniu zastosowano: albuminę surowicy krwi ludzkiej nasyconą kwasami tłuszczowymi (HSA), odtłuszczoną (HSA_{af}), liofilizowaną, frakcja V [MP BiomedicalsTM Inc, LLC, Francja]; D(-)-fruktozę (FRC); D(+)-glukozę (GLC); $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (dwuwodny diwodorofosforan(V) sodu); K_2HPO_4 (wodorofosforan(V) potasu) [POCH S.A., Polska]; azydek sodu (NaN_3) [SIGMA-ALDRICH Chemistry, Niemcy]; metanol do badań spektroskopowych [Merck KGaA, Niemcy].

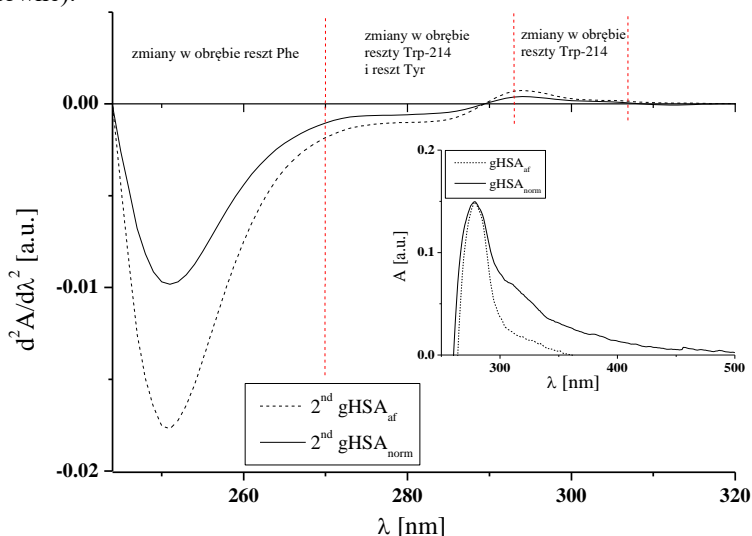
Glikowaną ludzką albuminę surowicy krwi (gHSA) nasyconą kwasami tłuszczowymi (KT) i fabrycznie odtłuszczoną (gHSA_{af}) o stężeniu $5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ otrzymano w warunkach laboratoryjnych poprzez inkubację albuminy (HSA i HSA_{af}) w obecności mieszaniny FRC i GLC (syrup glukozowo-fruktozowy, SGF) o stężeniu 0.05 mol dm^{-3} w buforze fosforanowym (pH 7.4 ± 0.1) z $0.015 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaN}_3$. Po okresie inkubacji (21 dni, $t = 37^\circ\text{C}$), w celu usunięcia niezwiązanej FRC i GLC, roztwory albuminy glikowanej (gHSA , gHSA_{af}) oraz niemodyfikowanej (HSA, HSA_{af}) dializowano ekstensywnie wobec buforu przez łączną liczbę 24h, a następnie przesączono przez filtry membranowe o średnicy porów $0.2 \mu\text{m}$.

Badania spektrofotometryczne przeprowadzono z wykorzystaniem spektrofotometru dwuwiązkowego firmy JASCO, model V-530, używając standardowych kuwet kwarcowych ($1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm} \times 4 \text{ cm}$). Widma absorpcyjne rejestrowano w zakresie długości fali $\lambda = 250\text{--}500 \text{ nm}$. Błąd aparaturowy dla długości fali promieniowania λ wynosi $\pm 1 \text{ nm}$, a dla absorbancji $A \pm 0.004$. Pomiar spektrofotometryczne przeprowadzono aparatem JASCO FP-6500. Błąd aparaturowy dla długości fali promieniowania λ wynosi $\pm 1.5 \text{ nm}$. Pozostałe parametry skanowania próbek: czas odpowiedzi 2s, szybkość skanowania 100 nm/min , szerokość pasma wzbudzenia/emisji $5/5 \text{ nm}$ oraz wzmocnienie sygnału „Medium”. Widma emisyjne albuminy gHSA_{af} i gHSA rejestrowano dla długości fali $\lambda_{\text{ex}} = 275 \text{ nm}$ ($\lambda_{\text{em}} = 285\text{--}400 \text{ nm}$) i $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ ($\lambda_{\text{em}} = 305\text{--}400 \text{ nm}$). Zamieszczone w pracy widma fluorescencyjne korygowano ze względu na rozproszenie promieniowania przez rozpuszczalnik przy użyciu programu Spectra Manager, a następnie poddano obróbce komputerowej z użyciem programu OriginPro 8.5. Dla zilustrowania subtelných zmian zachodzących w III-rzędowej strukturze glikowanej albuminy surowicy krwi wywołanych obecnością kwasów tłuszczowych w jej strukturze, dla widm absorpcyjnych i emisyjnych gHSA i gHSA_{af} poprzez nieliniową regresję wykreślono drugą pochodną przy użyciu cyfrowego algorytmu Savitzkiego i Golaya, stosując wielomian II stopnia i 15 punktów widma.

3. Wyniki i dyskusja

Zarejestrowano widma absorpcyjne glikowanej albuminy surowicy krwi ludzkiej nasyconej kwasami tłuszczowymi (gHSA) i albuminy odtłuszczonej (gHSA_{af}) o stężeniu $5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$. Następnie porównano widmo absorpcyjne gHSA_{af} z widmem absorpcyjnym gHSA unormowanym

arytmetycznie do widma $gHSA_{af}$ ($gHSA_{norm}$) (Rys.1, w insercie) oraz wykreślono drugą pochodną widma absorpcyjnego albuminy $gHSA_{af}$ i $gHSA_{norm}$ przy użyciu algorytmu Savitzkiego-Golaya (Rys.1, okno główne).



Rys. 1. Okno główne: druga pochodna widma absorpcyjnego albuminy $gHSA_{af}$ (2^{nd} $gHSA_{af}$) oraz $gHSA$ po wcześniejszym unormowaniu do widma $gHSA_{af}$ (2^{nd} $gHSA_{norm}$); na wykresie zaznaczono przedziały długości fali odpowiadające poszczególnym chromoforom albuminy; w insercie: widmo absorpcyjne $gHSA_{af}$ i $gHSA$ unormowane do widma $gHSA_{af}$ ($gHSA_{norm}$).

Z analizy widm elektronowych wynika, że glikowana, nasycona kwasami tłuszczowymi albumina surowicy krwi ludzkiej ($gHSA$) różni się strukturalnie względem albuminy odłuszczonej ($gHSA_{af}$). Wyższe wartości absorbancji zarejestrowano dla albuminy $gHSA$ niż $gHSA_{af}$ w całym badanym zakresie ($\lambda = 250\text{--}500\text{nm}$, z $\lambda_{max} = 279\text{nm}$) (Tab.1). Absorbancja promieniowania elektromagnetycznego w zakresie długości fali $\lambda = 250\text{--}305\text{nm}$ zależy głównie od zawartości reszt tyrozylowych (Tyr) oraz reszty tryptofanowej (Trp-214), natomiast w mniejszym stopniu od liczby reszt fenyloalaninowych (Phe) i w niewielkim stopniu od liczby wiązań disiarczkowych. Zmiany absorbancji w regionie $\lambda = 250\text{--}270\text{nm}$ przypisywane są modyfikacjom w środowisku reszt Phe, region $\lambda = 270\text{--}293\text{nm}$ opisuje zmiany w obrębie reszty Trp-214 i reszt Tyr, natomiast obszar $\lambda = 293\text{--}305\text{nm}$ odpowiada prawie wyłącznie zmianom w obrębie reszty Trp-214 (Bailestrieri i in. 1978). Z kolei wyraźnie widoczny na Rys.1 (w insercie) przyrost tła w regionie $\lambda = 305\text{--}500\text{nm}$ dla $gHSA_{norm}$ prawdopodobnie wynika z modyfikacji obszaru występowania reszt lizynyowych (Lys) i arginytowych (Arg) wywołanych większą ilością powstałych produktów glikacji (AGEs) (Schmitt i in. 2005; Szkudlarek i in. 2020). Większe wartości absorbancji albuminy $gHSA$ niż $gHSA_{af}$ (Tab.1) mogą świadczyć o występowaniu zmian konformacyjnych albuminy wywołanych obecnością kwasów tłuszczowych w strukturze makrocząsteczki i zwiększeniu efektywności procesu glikacji.

Tab. 1. Wartości absorbancji albuminy $gHSA_{af}$ i $gHSA$ o stężeniu $5 \times 10^{-6} \text{mol dm}^{-3}$ dla $\lambda_{max} = 279\text{nm}$, $\lambda = 330\text{nm}$, $\lambda = 360\text{nm}$ i $\lambda = 400\text{nm}$.

ABSORBANCJA				
	$\lambda_{max} 279\text{nm}$	$\lambda 330\text{nm}$	$\lambda 360\text{nm}$	$\lambda 400\text{nm}$
$gHSA_{af}$	0.1490	0.0126	0.0003	0.0001
$gHSA$	0.2690	0.0857	0.0480	0.0247

Pomiary absorbancji albuminy $gHSA_{af}$ i $gHSA$ pozwoliły na wykreślenie drugiej pochodnej widma UV albuminy $gHSA_{af}$ (2^{nd} $gHSA_{af}$) oraz drugiej pochodnej unormowanego arytmetycznie

widma UV zerowego rzędu gHSA do maksymalnej absorbancji uzyskanej dla widma zerowego rzędu gHSA_{af} (2nd gHSA_{norm}) (Rys.1, okno główne). Pierwsza pochodna dA/dλ widma jest szybkością zmiany absorbancji (A) następującej ze zmianą długości fali (λ). Druga pochodna d²A/dλ² to szybkość z jaką następuje ta zmiana (Kuś i in. 1996; Karpińska 2004). Analiza 2nd gHSA_{af} i 2nd gHSA_{norm} wykazała największe zmiany w otoczeniu 31 reszt Phe ulokowanych we wszystkich sześciu subdomenach albuminy. Ponadto zaobserwowano zmiany w okolicy występowania reszty Trp-214 (subdomena IIA) i 18 reszt Tyr (subdomena IA, IIA, IIIA, IB i IIB) (Rys.1, okno główne). Wynika to z faktu, iż zmiany konformacyjne indukowane obecnością kwasów tłuszczowych w glikowanej albuminie prawdopodobnie obejmują całość struktury makrocząsteczki, co w konsekwencji może prowadzić do modyfikacji funkcji fizjologicznych pełnionych przez albuminę. Podobne zależności zaobserwowali Maciążek-Jurczyk i wsp. w badaniach nad wpływem stresu oksydacyjnego na ludzką albuminę surowicy krwi. Na podstawie widm absorpcyjnych autorzy stwierdzili, że oksydacja albuminy przez chloraminę T wpływa na modyfikację jej struktury w środowisku reszt Phe, rozmieszczonych w całej konformacji albuminy, reszt Tyr i/lub reszty Trp-214 (Maciążek-Jurczyk i in. 2021).

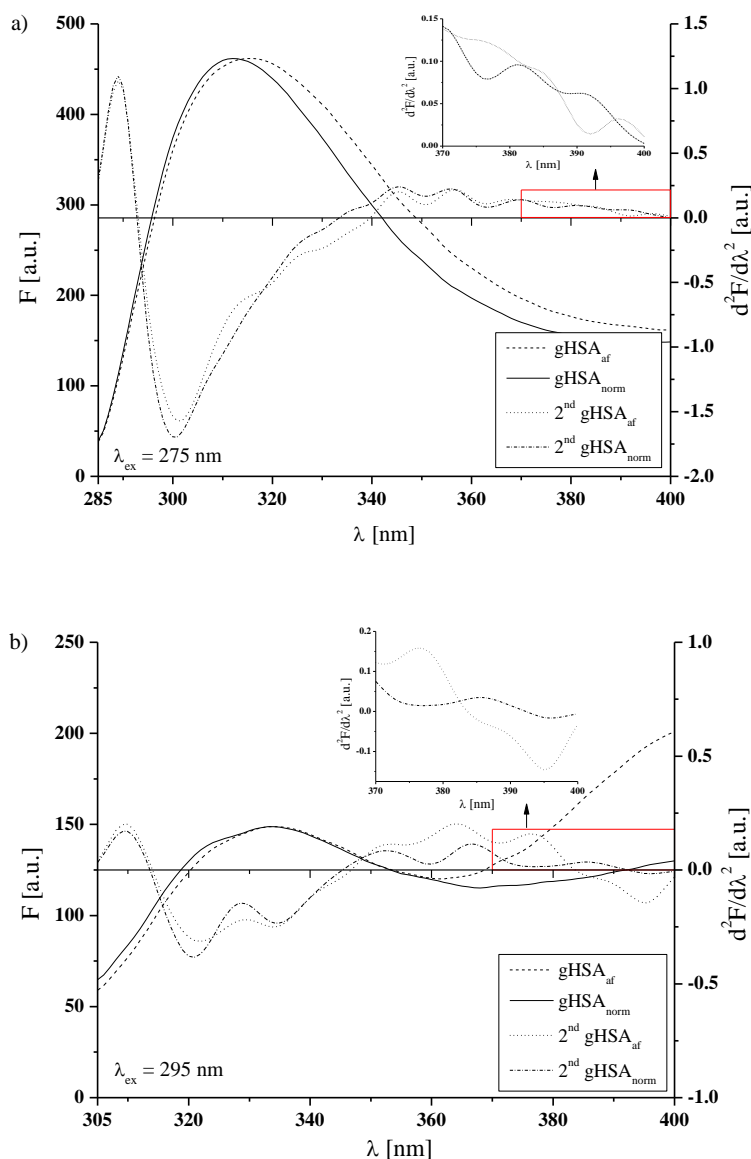
Do określenia wpływu kwasów tłuszczowych na zmiany konformacyjne glikowanej albuminy wykorzystano również technikę spektrofluymetrii. Promieniowanie o długości fali λ_{ex} = 275nm pozwala na obserwację fluorescencji określonych fluoroforów albuminy – reszty Trp-214 i reszt Tyr. Natomiast promieniowanie o długości fali λ_{ex} = 295nm wzbudza fluorescencję głównie reszty Trp-214 (Lakowicz 2006; Szkudlarek i in. 2020). Rys.2 przedstawia widmo emisyjne albuminy gHSA_{af} i unormowane arytmetycznie do widma gHSA_{af} widmo emisyjne albuminy gHSA (gHSA_{norm}) oraz ich drugie pochodne (2nd gHSA_{af}, 2nd gHSA_{norm}) dla długości fali λ_{ex} = 275nm (Rys.2a) i λ_{ex} = 295nm (Rys.2b) (w insercie Rys.2a i b umieszczono 2nd gHSA_{af} i 2nd gHSA_{norm} dla zakresu λ = 370–400nm).

Zarówno dla λ_{ex} = 275nm, jak i λ_{ex} = 295nm wykazano zmiany w przebiegu drugich pochodnych albuminy gHSA_{af} względem albuminy gHSA_{norm} (Rys.2). W Tabeli II umieszczono wyznaczone metodą „pik do pikii” wartości empirycznego parametru H (*relative peak composition*) dla 2nd gHSA_{af} i 2nd gHSA_{norm} oraz długości fali dla minimum (λ_{min}) i dla maksimum (λ_{max}) pikii w danym obszarze. Dla λ_{ex} = 275nm parametr H_{275nm} jest różnicą drugiej pochodnej widma między wartością bezwzględną minimum i maksimum poniżej długości fali λ = 320nm, natomiast dla λ_{ex} = 295nm parametr H_{295nm} obliczany jest jako różnica między minimum a maksimum w zakresie długości fali λ = 370–400nm (Kumar i in. 2005; Mozo-Villarias 2002). Zwiększenie wartości parametru H wskazuje na wzrost hydrofobowości, a jego zmniejszenie – na wzrost hydrofilowości otoczenia występowania reszt Tyr lub reszty Trp-214.

Tab.2 Wartości parametru H oraz długości fali dla minimum (λ_{min}) i dla maksimum (λ_{max}) przebiegu drugiej pochodnej gHSA_{af} i gHSA_{norm} w odpowiednim obszarze, λ_{ex} = 275nm i λ_{ex} = 295nm.

	H _{275nm}	λ _{min} [nm]	λ _{max} [nm]	H _{295nm}	λ _{min} [nm]	λ _{max} [nm]
2 nd gHSA _{af}	2.633	301	289	0.304	395	376
2 nd gHSA _{norm}	2.799	300	289	0.052	396	386

Niewielkie różnice w wartościach parametru H_{275nm} dla gHSA_{af} i gHSA sugerują nieznaczne zwiększenie hydrofobowości środowiska w okolicy występowania reszt Tyr glikowanej albuminy w obecności kwasów tłuszczowych. Z kolei znaczna różnica w wartości parametru H_{295nm} wskazuje na istotne zwiększenie hydrofilowości w środowisku występowania reszty Trp-214 albuminy gHSA względem gHSA_{af} (Tab.2).



Rys. 2. Okno główne: emisyjne widmo fluorescencyjne $gHSA_{af}$ i znormalizowane do widma $gHSA_{af}$ emisyjne widmo albuminy $gHSA$ ($gHSA_{norm}$) oraz ich drugie pochodne ($2^{nd} gHSA_{af}$, $2^{nd} gHSA_{norm}$); w insercie: drugie pochodne widma $gHSA_{af}$ i $gHSA_{norm}$ ($2^{nd} gHSA_{af}$, $2^{nd} gHSA_{norm}$) w zakresie $\lambda = 370$ – 400 nm; **a)** $\lambda_{ex} = 275$ nm, **b)** $\lambda_{ex} = 295$ nm.

4. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowano następujące wnioski: (i) kwasy tłuszczowe (KT) indukują modyfikacje konformacyjne glikowanej albuminy oraz intensyfikują proces glikacji, a analiza drugich pochodnych widm elektronowych potwierdza zmiany w obszarze występowania reszt fenyloalaninyowych (Phe, rozmieszczonych we wszystkich subdomenach albuminy), reszty tryptofanowej (Trp-214, zlokalizowanej w subdomenie IIA) i reszt tyrozylowych (Tyr, obecnych w subdomenach IIA, IIIA, IB i IIB albuminy); (ii) analiza widm emisyjnych oraz ich drugich pochodnych wykazała nieznaczny wzrost hydrofobowości otoczenia reszt Tyr, a znaczny wzrost hydrofilowości okolicy reszty Trp-214 glikowanej w obecności kwasów tłuszczowych

albuminy; (iii) zmiany środowiska zachodzące w obrębie Trp-214 oraz reszt Tyr rozlokowanych m.in. w pobliżu I (subdomena IIA) i II (subdomena IIIA) miejsca wiązania leków zgodnie z nomenklaturą Sudlowa, wywołane obecnością KT w cząsteczce glikowanej albuminy, mogą istotnie wpływać na poziom wolnej frakcji leków stosowanych w terapii osób cierpiących na cukrzycę. W związku z tym, konieczna może być kontrola ilości KT dostarczanych wraz z dietą i/lub suplementacją bądź personalizacja dawek leków wiążących się do albuminy.

Praca zrealizowana ze środków finansowych umowy realizowanej przez Młodego Naukowca nr: **PCN-2-012/K/1/F** i **PCN-2-013/K/2/F**.

5. Literatura

- Balestrieri C, Colonna G, Giovane A et al. (1978) Second-Derivative Spectroscopy of Proteins. *Eur J Biochem* 90: 433–440.
- Karpińska J (2004) Derivative spectrophotometry – recent applications and directions of developments. *Talanta* 64: 801–822.
- Kumar V, Sharma VK, Kalonia DS (2005) Second derivative tryptophan fluorescence spectroscopy as a tool to characterize partially unfolded intermediates of proteins. *Int J Pharm* 294(1-2): 193–199.
- Kuś S, Marzenko Z, Obarski N (1996) Derivative UV-Vis Spectrophotometry in Analytical Chemistry. *Chem Anal* 41: 899–927.
- Lakowicz JR (2006) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York: Springer.
- Levine RL, Federici MM (1982) Quantitation of aromatic residues in proteins: model compounds for second-derivative spectroscopy. *Biochemistry* 21(11): 2600-2606.
- Maciążek-Jurczyk M, Morak-Młodawska B, Jeleń M et al. (2021) The Influence of Oxidative Stress on Serum Albumin Structure as a Carrier of Selected Diazaphenothiazine with Potential Anticancer Activity. *Pharmaceuticals* 14: 285.
- Mihalyi E (1968) Numerical values of the absorbances of the aromatic amino acids in acid, neutral, and alkaline solutions. *J Chem Eng Data* 13(2): 179–182.
- Mozo-Villarias A (2002) Second derivative fluorescence spectroscopy of tryptophan in proteins. *J Biochem Biophys Methods* 50(2-3): 163–178.
- Schmitt A, Schmitt J, Münch G et al. (2005) Characterization of advanced glycation end products for biochemical studies: side chain modifications and fluorescence characteristics. *Anal Biochem* 338: 201–215.
- Szkudlarek A, Wilk M, Maciążek-Jurczyk M (2020) In Vitro Investigations of Acetohexamide Binding to Glycated Serum Albumin in the Presence of Fatty Acid. *Molecules* 25: 2340.

8. Kwasy tłuszczowe jako inhibitory produktów glikacji albuminy surowicy krwi ludzkiej

Fatty acids as inhibitors of glycation products of human serum albumin

Szkudlarek Agnieszka

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

Szkudlarek agnieszka: aszkudlarek@sum.edu.pl

Słowa kluczowe: AGEs, inhibitory glikacji, HSA, kwasy tłuszczowe, spektrofлуorymetria

Streszczenie

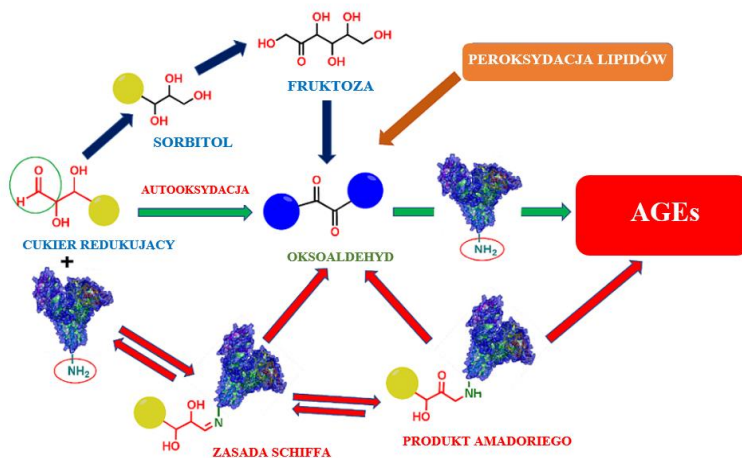
Jednym z procesów powodujących utratę pierwotnych właściwości albuminy surowicy krwi ludzkiej (HSA) jest nasilona w stanie hiperglikemii glikacja. Związki powstałe w końcowym etapie tego procesu, tzw. końcowe produkty zaawansowanej glikacji (AGEs) – odgrywają dominującą rolę w rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycowych o charakterze mikro- i makroangiopatii, czy też procesów degeneracyjnych związanych z wiekiem. Wobec spostrzeżeń sugerujących udział AGEs w etiopatogenezie wielu chorób, zahamowanie tworzenia AGEs poprzez zastosowanie inhibitorów jest obiecującym celem terapeutycznym. Wykorzystując technikę spektroskopii fluorescencyjnej zbadano wpływ kwasów tłuszczowych na powstawanie AGEs. Analizie poddano fluorescencyjne widma emisyjne, synchroniczne oraz wzbudzeniowe produktów glikacji albuminy fruktozą (gHSA_{FRC}) (zawierającej kwasy tłuszczowe) oraz widma fluorescencyjne AGEs obecnych w próbce kontrolnej, którą stanowił handlowy preparat białka (HSA). Ponadto stosując identyczne parametry widmowania zarejestrowano fluorescencję AGEs albuminy pozbawionej kwasów tłuszczowych – fabrycznie odtłuszczonej ((af)HSA, (af)gHSA_{FRC}). Jak wykazano, glikacja albuminy (af)HSA przebiega silniej w porównaniu do albuminy zawierającej kwasy tłuszczowe (HSA). Przedstawione w pracy wyniki jednoznacznie wskazują, że kwasy tłuszczowe hamują tworzenie się końcowych produktów glikacji albuminy, można więc twierdzić, że wykazują charakter inhibitora glikacji białek. Zwiększenie ilości kwasów tłuszczowych dostarczanych do organizmu wraz z dietą bądź w postaci suplementów może zmniejszyć częstość występowania lub/i nasilenie powikłań w przebiegu m.in. nefropatii, neuropatii, retinopatii czy choroby Alzheimera.

1. Wstęp

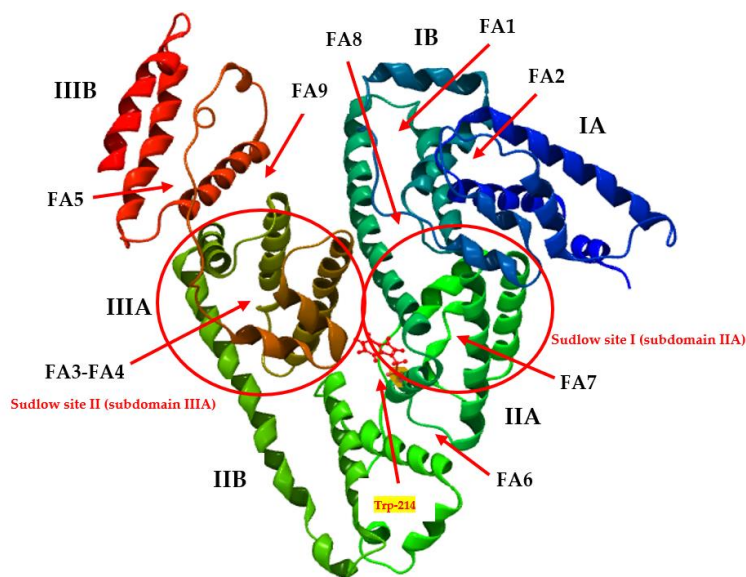
Akumulacja zaawansowanych, końcowych produktów glikacji (AGEs) *in vivo*, które powstają w ostatnim etapie glikacji białek, odgrywa dominującą rolę w rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycowych o charakterze mikro- i makroangiopatii oraz w procesie starzenia się organizmu (Vlassara i in. 1994). AGEs stanowią heterogenną mieszaninę związków o różnych masach cząsteczkowych i charakterystycznych właściwościach. Niektóre z nich wykazują zdolność do absorpcji i fluorescencji, a także posiadają możliwość tworzenia wiązań poprzecznych między białkami (Warwas i in. 2010; Nawale i in. 2006). W organizmie, całkowitą pulę AGEs stanowią zarówno endogenne związki powstające wewnątrz, jak i na zewnątrz komórek (pre-melanoidyny) oraz egzogenne AGEs znane jako MRP (*Maillard Reaction Products*), które pochodzą z pokarmu lub używek (melanoidyny) (Uribarri i in. 2010). Ponadto końcowe produkty glikacji można otrzymać nie tylko na drodze nieenzymatycznej *reakcji Maillarda*, ale również w szlaku polioliowym i na skutek peroksydacji lipidów (Sharat i Atanu Singha 2022) (Rys.1).

W warunkach homeostazy znaczna ilość produktów glikacji ulega degradacji i usunięciu z organizmu, natomiast w stanie hiperglikemii nasilona glikacja przyczynia się do akumulacji AGEs w ustroju upośledzając różne właściwości fizykochemiczne i biologiczne m.in. albuminy surowicy krwi ludzkiej (HSA). Albumina jako główne białko nośnikowe transportuje do tkanek organizmu wiele egzo- i endogennych związków, w tym kwasów tłuszczowych (KT). KT pełnią w organizmie istotne funkcje, m.in. są wykorzystywane jako substraty energetyczne w procesie β-oksydacji,

stanowią element budulcowy fosfolipidów, z których tworzone są błony biologiczne, są też prekursorami tak ważnych mediatorów biologicznych jak prostaglandyny, leukotrieny i tromboksany (Berk i Stump 1999). W cząsteczce albuminy istnieje dziewięć miejsc wiążących KT, które rozmieszczone są w sposób asymetryczny i obejmują wszystkie sześć subdomen makrocząsteczki. Największe powinowactwo do kwasów tłuszczowych wykazują miejsca oznaczone jako FA2, FA4 i FA5 (Simard i in. 2006) (Rys.2).



Rys.1. Schemat glikacji białek z utworzeniem końcowych produktów zaawansowanej glikacji AGEs (Sharat i Atanu Singha 2022).



Rys. 2. Trójwymiarowa struktura ludzkiej albuminy surowicy krwi (HSA) z wyróżnieniem I i II miejsca wiązania według nomenklatury Sudlowa oraz z miejscami wiązania kwasów tłuszczowych (FA1–FA9) (Szkudlarek i in. 2022).

Wiele badań potwierdza, że obecność KT istotnie wpływa na proces wiązania leków przez albuminę, szczególnie leków o dużym powinowactwie do makrocząsteczki. Kwasy tłuszczowe mogą

współzawodniczyć o miejsce wiązania w cząsteczce HSA bądź oddziaływać kooperacyjnie z lekami (Bhattacharya i in. 2000).

Mając na uwadze spostrzeżenia wskazujące na rolę AGEs w etiopatogenezie wielu chorób, zahamowanie powstawania AGEs przy użyciu inhibitorów glikacji stanowi obiecujący cel terapeutyczny. W związku z tym, celem niniejszej pracy było zbadanie czy obecność kwasów tłuszczowych w strukturze albuminy surowicy krwi ludzkiej może wpływać na proces glikacji tej makrocząsteczki oraz, co za tym idzie, na tworzenie zaawansowanych produktów glikacji AGEs.

2. Materiał i metody

W badaniu zastosowano: albuminę surowicy krwi ludzkiej nasyconą kwasami tłuszczowymi (HSA), odtłuszczoną ((af)HSA), liofilizowaną, frakcja V [MP BiomedicalsTM Inc, LLC, Francja]; D(-)-fruktozę (FRC); Tris (hydroksymetylo)aminometan (TRIS) i kwas solny (0.1 mol dm^{-3} , HCl) [POCH S.A., Polska]; azyd sodu (NaN_3) [SIGMA-ALDRICH Chemistry, Niemcy]; metanol do badań spektroskopowych [Merck KGaA, Niemcy].

Glikowaną ludzką albuminę surowicy krwi (gHSA_{FRC}) nasyconą kwasami tłuszczowymi (KT) i fabrycznie odtłuszczoną ((af) gHSA_{FRC}) o stężeniu $5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ otrzymano w warunkach laboratoryjnych poprzez inkubację HSA i (af)HSA z FRC o stężeniu 0.05 mol dm^{-3} w buforze TRIS-HCl (pH 7.4 ± 0.1) w obecności $0.015 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaN}_3$. Po okresie inkubacji (21 dni, $t = 37^\circ\text{C}$), w celu usunięcia niezwiązanej FRC, roztwory albuminy glikowanej (gHSA_{FRC} , (af) gHSA_{FRC}) oraz niemodyfikowanej (HSA, (af)HSA) dializowano ekstensywnie wobec buforu TRIS-HCl przez łączną liczbę 24h.

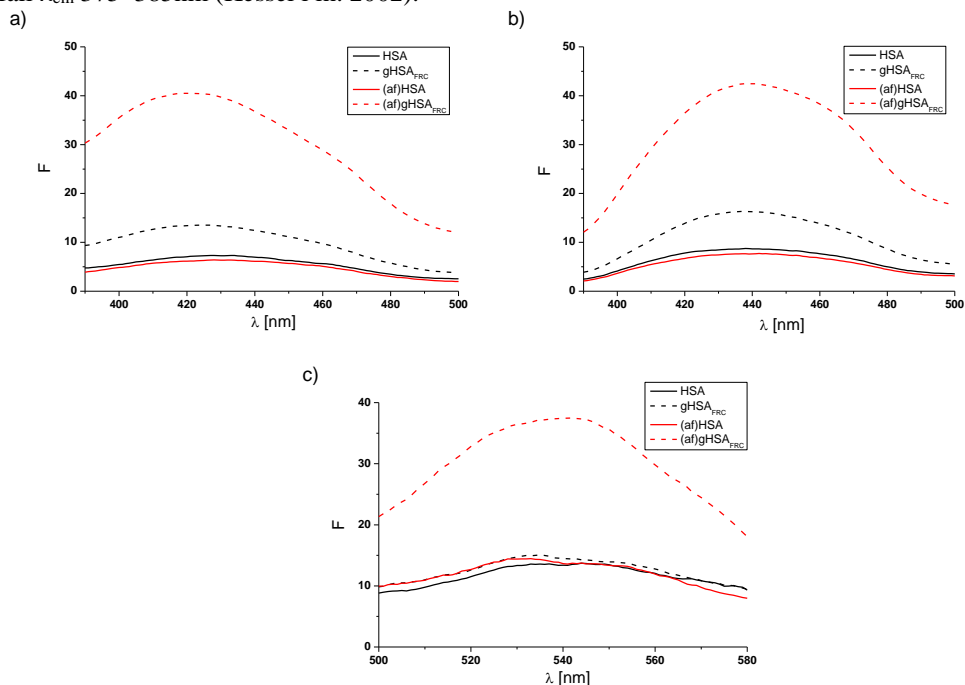
Fluorescencyjne widma emisyjne, synchroniczne i wzbudzeniowe AGEs obecnych w HSA, (af)HSA i powstałych w gHSA_{FRC} , (af) gHSA_{FRC} zarejestrowano spektrofluorymetrem JASCO FP-6500 z użyciem standardowych kuwet kwarcowych ($1\text{cm} \times 1\text{cm} \times 4\text{cm}$). Fluorescencję AGEs wzbudzano promieniowaniem o długości fali $\lambda_{\text{ex}} 335\text{nm}$, $\lambda_{\text{ex}} 370\text{nm}$ i $\lambda_{\text{ex}} 485\text{nm}$, a rejestrowano w zakresie odpowiednio 390–500nm i 500–580nm. Synchronicznie fluorescencję AGEs wzbudzano długościami fali z przedziału $\lambda_{\text{ex}} 320\text{--}440\text{nm}$ i rejestrowano w przedziale 360–480nm, co odpowiada $\Delta\lambda 40\text{nm}$. Widma wzbudzeniowe AGEs otrzymano przez napromieniowanie badanych próbek długościami fali z zakresu $\lambda_{\text{ex}} 315\text{--}400\text{nm}$. Emisję fluorescencji AGEs rejestrowano dla ustalonej długości fali $\lambda_{\text{em}} 430\text{nm}$. Zamieszczone w pracy widma fluorescencyjne korygowano ze względu na rozproszenie promieniowania przez rozpuszczalnik przy użyciu programu Spectra Manager, a następnie poddano obróbce komputerowej z użyciem programu OriginPro 8.5.

3. Wyniki i dyskusja

Rys.3a-c przedstawia emisyjne widma fluorescencyjne produktów glikacji (AGEs) glikowanej (gHSA_{FRC} , (af) gHSA_{FRC}) i niemodyfikowanej (HSA, (af)HSA) ludzkiej albuminy surowicy krwi. Fluorescencję AGEs wzbudzano długością fali $\lambda_{\text{ex}} 335\text{nm}$ (Rys.3a), $\lambda_{\text{ex}} 370\text{nm}$ (Rys. 3b) i $\lambda_{\text{ex}} 485\text{nm}$ (Rys.3c).

Dla wyekspozowania zaobserwowanych zmian intensywności fluorescencji AGEs (af) gHSA_{FRC} i gHSA_{FRC} , dla trzech długości fali wzbudzającej $\lambda_{\text{ex}} 335\text{nm}$ (Rys.3a), $\lambda_{\text{ex}} 370\text{nm}$ (Rys.3b), $\lambda_{\text{ex}} 485\text{nm}$ (Rys.3c) wyliczono ilorazy fluorescencji produktów glikacji $F_{(\text{af})\text{gHSA}}/F_{(\text{af})\text{HSA}}$ i $F_{\text{gHSA}}/F_{\text{HSA}}$ w maksimum ich emisji. Dla albuminy wolnej od kwasów tłuszczowych (KT) iloraz intensywności fluorescencji AGEs (af) gHSA_{FRC} i (af)HSA wyniósł: 6.32 ($\lambda_{\text{ex}} 335\text{nm}$), 5.51 ($\lambda_{\text{ex}} 370\text{nm}$) i 2.51 ($\lambda_{\text{ex}} 485\text{nm}$), natomiast dla albuminy zawierającej KT był równy: 1.85 ($\lambda_{\text{ex}} 335\text{nm}$), 1.87 ($\lambda_{\text{ex}} 370\text{nm}$) i 1.10 ($\lambda_{\text{ex}} 485\text{nm}$). Jak wykazano, glikacja albuminy (af)HSA pozbawionej KT przebiega silniej w porównaniu do HSA zawierającej KT. Wyznaczony iloraz fluorescencji AGEs $F_{(\text{af})\text{gHSA}}/F_{(\text{af})\text{HSA}}$ w maksimum emisji jest ~ 3.5-krotnie większy dla albuminy odtłuszczonej niż iloraz fluorescencji AGEs $F_{\text{gHSA}}/F_{\text{HSA}}$ otrzymany dla albuminy zawierającej KT (Rys.3a). Zastosowanie promieniowania o długości fali z przedziału 320–335nm oraz 325–335nm powoduje wzbudzenie odpowiednio argipirymidyny i pentozydyny. Argipirymidyna i pentozydyna – AGEs, które wykazują właściwości fluorescencyjne, powstają w wyniku modyfikacji białek metyloglioksałem (MG) poprzez angażowanie reszty argininyłowej (Arg) makromolekuły. Argipirymidyna emituje

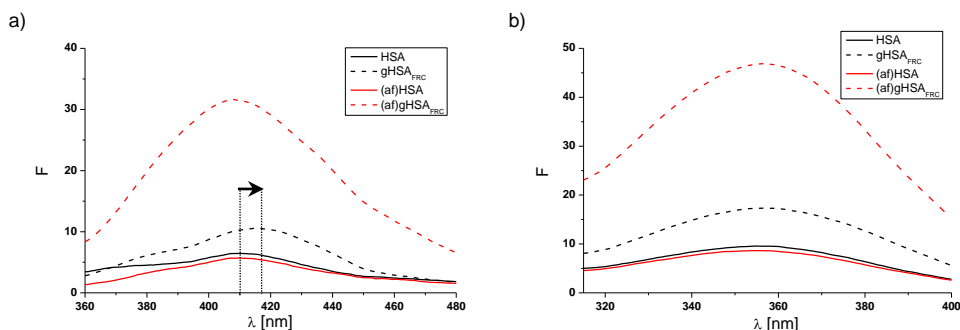
fluorescencją o długości fali $\lambda_{em} \sim 400\text{nm}$, podczas gdy pentozydyna emituje fluorescencją o długości fali $\lambda_{em} 375\text{--}385\text{nm}$ (Kessel i in. 2002).



Rys. 3. Emisyjne widma fluorescencji produktów glikacji (AGEs) ludzkiej albuminy surowicy krwi, odftuszczonej ((af)HSA, (af)gHSA_{FRC}) i nasyconej kwasami tłuszczowymi (HSA, gHSA_{FRC}) a) λ_{ex} 335nm, b) λ_{ex} 370nm, c) λ_{ex} 485nm, [HSA, (af)HSA, gHSA_{FRC}, (af)gHSA_{FRC}] 5×10^{-6} mol dm⁻³; t = 37°C.

Wzbudzone w niniejszej pracy promieniowaniem o długości fali λ_{ex} 335nm AGEs albuminy HSA i gHSA_{FRC} oraz (af)HSA i (af)gHSA_{FRC} (Rys.3a) nie wykazują fluorescencji typowej dla pentozydyny i argpirymidyny. Fluorescencja AGEs o długości fali λ_{em} 420nm i λ_{em} 425nm sugeruje tworzenie się pentozydyny i argpirymidyny w glikowanych białkach, ale także wskazuje na obecność dodatkowych fluoroforów ze względu na przesunięcie maksimum fluorescencji w kierunku długofalowym względem emisji fluorescencji pentozydyny i argpirymidyny opisaną przez Kessel i wsp. (Kessel i in. 2002). Wzbudzenie długością fali λ_{ex} 370nm HSA glikowanej FRC powoduje emisję fluorescencji AGEs o długości fali $\lambda_{em} \sim 440\text{nm}$ (Rys.3b). Podobne wyniki otrzymali Vetter i Indurthi badając roztwory albuminy wołowej modyfikowanej metyloglioksałem i glukozą (λ_{ex} 365nm), a także Schmitt i wsp. badając HSA modyfikowaną glukozą, metyloglioksałem i gliceraldehydem (λ_{ex} 360nm) (Vetter i Indurthi 2011; Schmitt i in. 2005). Schmitt i wsp. wzbudzali ponadto długością fali λ_{ex} 485nm rejestrując maksimum fluorescencji AGEs w okolicy λ_{em} 530nm. Naukowcy stwierdzili, że czynnikiem sprzyjającym prowadzeniu pomiarów dla długości fali powyżej λ_{ex} 450nm jest brak zakłóceń w postaci absorpcji przez inne fluorofory obecne w próbce. Według autorów fluorescencja z maksimum emisji dla λ_{em} 440nm i λ_{em} 530nm wydaje się być wskaźnikiem modyfikacji reszt argininyłowych. Podczas doświadczenia prowadzonego w prezentowanej pracy wzbudzenie długością fali λ_{ex} 485nm spowodowało wzrost fluorescencji AGEs w maksimum emisji $\lambda_{em} \sim 540\text{nm}$ o 70% tylko dla (af)gHSA_{FRC} (Rys.3c), co może wskazywać na jej modyfikacje strukturalne w okolicy występowania reszty Arg-10, Arg-98, Arg-160 i Arg-209 (Zoellner i in. 2001).

Na Rys.4 przedstawiono synchroniczne (Rys.4a) i wzbudzeniowe (Rys.4b) widma fluorescencyjne AGEs powstałe w glikowanej (af)gHSA_{FRC} i gHSA_{FRC}, a także obecne w niemodyfikowanej albuminie (af)HSA, HSA.



Rys. 4. Fluorescencja produktów glikacji (AGEs) odtuszczonej ((af)HSA_{FRC}, (af)HSA) i nasyconej (gHSA_{FRC}, HSA) kwasami tłuszczowymi albuminy surowicy krwi o stężeniu 5×10^{-6} mol dm⁻³ a) widma synchroniczne, $\Delta\lambda$ 40nm, b) widma wzbudzeniowe, λ_{em} 430nm.

Po 21 dniach inkubacji roztworów albuminy w stałej temperaturze, zarejestrowano znaczne różnice w intensywności fluorescencji AGEs powstałych w roztworach odtuszczonej ((af)gHSA_{FRC}) i nasyconej kwasami tłuszczowymi (gHSA_{FRC}) albuminy (Rys.4ab). Fluorescencja produktów glikacji (af)gHSA_{FRC} zarejestrowana w trybie synchronicznym (Rys.4a) oraz w trybie wzbudzeniowym (Rys.4b) wzrosła odpowiednio 3.5-krotnie i 3-krotnie względem intensywności fluorescencji AGEs gHSA_{FRC}. Ponadto fluorescencja AGEs (af)gHSA_{FRC} zarejestrowana w trybie synchronicznym wzrosła 5.5-krotnie względem intensywności fluorescencji AGEs obecnych w niemodyfikowanej (af)HSA. Glikacja albuminy nasyconej kwasami tłuszczowymi spowodowała tylko 1.6-krotny wzrost fluorescencji oraz przesunięcie maksimum emisji AGEs o 6 nm w stronę długofalową w porównaniu do położenia maksimum emisji fluorescencji AGEs nieglikowanej HSA (Rys.4a). Dla widm wzbudzeniowych, ilorazy intensywności fluorescencji AGEs $F_{(af)gHSA}/F_{(af)HSA}$ i F_{gHSA}/F_{HSA} w maksimum emisji wynoszą odpowiednio 5.42 i 1.82 (Rys.4b). Znaczny wzrost intensywności fluorescencji AGEs albuminy pozbawionej kwasów tłuszczowych może wynikać z faktu, iż czynnikiem silnie wpływającym na szybkość glikacji makrocząsteczki jest dostępność grupy ε-aminowej reszt lizyny (głównie Lys-525), które w warunkach *in vitro* prawdopodobnie przysłonięte są przez cząsteczki kwasu tłuszczowego, przez co nie ulegają glikacji (Garlick i Mazer 1983).

4. Wnioski

Przedstawione w pracy wyniki jednoznacznie wskazują, że kwasy tłuszczowe hamują tworzenie się końcowych produktów glikacji albuminy, można więc twierdzić, że wykazują charakter inhibitora nieenzymatycznej glikacji białek. Zwiększenie ilości kwasów tłuszczowych dostarczanych do organizmu wraz z dietą bądź w postaci suplementów może zmniejszyć częstość występowania lub/i nasilenie powikłań w przebiegu m.in. nefropatii, neuropatii, retinopatii czy choroby Alzheimer'a.

Praca zrealizowana ze środków finansowych umowy realizowanej przez Młodego Naukowca nr: PCN-2-012/K/1/F i PCN-2-013/K/2/F.

5. Literatura

- Berk PD, Stump DD (1999) Mechanisms of cellular uptake of long chain free fatty acids. *Mol Cell Biochem* 192(1-2): 17–31.
- Bhattacharya AA, Grüne T, Curry S (2000) Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin. *J Mo Biol* 303(5): 721–732.
- Garlick RL, Mazer JS (1983) The principal site of nonenzymatic glycosylation of human serum albumin in vivo. *J Biol Chem* 258(10): 6142–6146.

- Kessel L, Kalinin S, Nagaraj RH et al. (2002) Time-resolved and steady-state fluorescence spectroscopic studies of the human lens with comparison to argpyrimidine, pentosidine and 3-OH-kynurenine. *Photochem Photobiol* 76(5): 549–554.
- Nawale RB, Mourya VK, Bhise SB (2006) Non-enzymatic glycation of proteins: a cause for complication in diabetes. *Indian Biochem Biophys* 43: 337–344.
- Schmitt A, Schmitt J, Münch G et al. (2005) Characterization of advanced glycation end products for biochemical studies: side chain modifications and fluorescence characteristics. *Anal Biochem* 338(2): 201–215.
- Sharat S, Atanu Singha R (2022) A review on prevention of glycation of proteins: Potential therapeutic substances to mitigate the severity of diabetes complications. *International Journal of Biological Macromolecules* 195: 565–588.
- Simard JR, Zunszain PA, Hamilton JA et al. (2006) Locating of high and low affinity fatty acid binding sites on human serum albumin revealed by NMR drug-competition analysis. *J. Mol Biol* 361: 336–351.
- Szkudlarek A, Pożycka J, Kulig K et al. (2022) Changes in Glycated Human Serum Albumin Binding Affinity for Losartan in the Presence of Fatty Acids In Vitro Spectroscopic Analysis. *Molecules* 27: 401.
- Uribarri J, Woodruff S, Goodman S et al. (2010) Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *J Am Diet Assoc* 110: 911–916.
- Vetter SW, Indurthi VS (2011) Moderate glycation of serum albumin affects folding, stability and ligand binding. *Clin Chim Acta* 412(23–24): 2105–2116.
- Vlassara H, Bucala R, Striker L (1994) Pathogenic effects of advanced glycosylation: Biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging. *Lab Invest* 70: 138–151.
- Warwas M, Piwowar A, Kopiec G (2010) Zaawansowane produkty glikacji (AGE) w organizmie – powstawanie, losy, interakcja z receptorami i jej następstwa. *Farm Pol* 66(8): 585–590.
- Zoellner H, Hou JY, Hochgrebe T et al. (2001) Fluorometric and mass spectrometric analysis of nonenzymatic glycosylated albumin. *Biochem Biophys Res Commun* 284: 83–89.

9. Fizykochemiczne i biomedyczne właściwości cytochromu P450

Physicochemical and biomedical properties of cytochrome P450

Trzaska Sabina^(1,2), Chadryś Katarzyna⁽¹⁾, Wiejak Marta⁽¹⁾, Światała Zuzanna^(1,2), Wnęk Zuzanna^(1,2), Szwabowicz Izabella^(1,2), Dudkiewicz Karolina⁽¹⁾, Janikowska Grażyna⁽³⁾

⁽¹⁾Młoda Farmacja Sosnowiec,

⁽²⁾Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Chemii Analitycznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach,

⁽³⁾Zakład Chemii Analitycznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec

Sabina Trzaska: st2002@interia.pl

Słowa kluczowe: CYP, metabolizm, steroidogeneza, wielonienasycone kwasy tłuszczowe.

Streszczenie

Cytochrom P450 (CYP) jest nadrodziną enzymów kodowanych przez geny *CYP*. Enzymy zawierają hem jako kofaktor. CYP w komórkach eukariotycznych ma masę cząsteczkową 50 – 55 kDa i formę białka błonowego występującego w retikulum endoplazmatycznym oraz w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Hemoproteiny te wykazują aktywność monoooksygenazową odgrywając kluczową rolę w detoksykacji ksenobiotyków, metabolizmie komórkowym i homeostazie. Po związaniu *in vitro* z tlenkiem węgla większość z nich wykazuje maksimum absorpcji światła przy długości fali równej 450 nm w stanie zredukowanym, skąd pochodzi ich nazwa P450 (pigment absorbujący długość fali 450 nm). Enzym ten jest inaktywowany przez cyjanki oraz tlenek węgla. Aktywność CYP można oznaczać spektrofotometrycznie. Zdolność do hamowania i indukowania układu enzymatycznego CYP mają nie tylko leki, ale również chemioterapeutyki, zioła, żywność, ksenobiotyki środowiskowe i wiele innych. Analizy *in silico* pozwoliły na identyfikację kilku mikroRNA regulujących CYP. Polimorfizmy genetyczne i zmiany epigenetyczne w genach *CYP* odpowiedzialne są za międzyosobnicze i międzyetniczne zróżnicowanie podatności na choroby i skuteczność terapeutyczną leków. Enzymy cytochromu P450 odgrywają ważną rolę w syntezie hormonów steroidowych (steroidogeneza) i biorą udział w metabolizowaniu wielonienasyconych kwasów tłuszczowych i wielu innych związków. Znaczenie biomedyczne tych cząsteczek oparte jest na metabolizmie leków i ksenobiotyków oraz roli biomarkerów w wielu chorobach.

1. Wprowadzenie

Cytochrom P450 (CYP) to nadrodzina enzymów zidentyfikowanych we wszystkich królestwach: zwierząt, roślin, grzybów, bakterii, wirusów i innych. Enzymy te odpowiedzialne są za biosyntezę i metabolizm, za katalizowanie reakcji utleniania w organizmach żywych. Białka te są obecne u organizmów prokariotycznych i eukariotycznych, a u ssaków są szczególnie ważne dla biosyntezy i metabolizmu dużej liczby związków endogennych (cholesterolu, hormonów, kwasów tłuszczowych, witamin) i egzogennych (leków, rozpuszczalników, pestycydów i innych związków chemicznych oraz toksycznych metabolitów, np. bilirubiny). Dlatego dogłębne poznanie ich właściwości fizykochemicznych i biomedycznych może pozwolić na lepsze ich zrozumienie.

2. Fizykochemiczne właściwości cytochromu P450

Cytochrom P450 (CYP) jest rodziną enzymów zawierających hem jako kofaktor, tak więc nazywane są hemoproteinami. Centrum aktywne cytochromu P450 zawiera żelazo w układzie hemowym. Żelazo jest związane z białkiem poprzez ligand tiolanowy cysteiny. Cysteina i flankujące reszty są wysoce konserwatywne w P450. CYP w komórkach eukariotycznych występuje w formie białka błonowego w retikulum endoplazmatycznym i wewnętrznej błonie mitochondrialnej, wykazując masę cząsteczkową 50-100 kDa (Manikandan i Nagini 2018). Hemoproteiny te wykazują również aktywność monoooksygenazową odgrywając kluczową rolę w detoksykacji ksenobiotyków,

metabolizmie komórkowym i homeostazie. Nazwa P450 pochodzi od wiązania tego białka *in vitro* z tlenkiem węgla i wykazywania maksimum absorpcji promieniowania przy długości fali równej 450 nm w stanie zredukowanym (pigment absorbujący λ 450 nm), przez co można oznaczać jego aktywność spektrofotometrycznie. Cytochrom P450 wykazuje silną inaktywację przez cyjanki oraz tlenek węgla blokując miejsca aktywne tego enzymu (Zhao i in. 2021). W miejscu jego występowania, czyli w błonach retikulum endoplazmatycznego elektrony są przekazywane bezpośrednio z NADPH na cytochrom, przy udziale kompleksu reduktazy NADPH-cytochrom P450 będącego flawoproteina, zakotwiczoną w jednej warstwie błony łańcuchem hydrofobowym. Natomiast, przy przekazywaniu drugiego elektronu w cyklu może brać udział cytochrom b5 i reduktaza cytochrom b5 – cytochrom P450, będąca flawoproteina. Natomiast w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, elektrony z NADPH na cytochrom P450 przekazywane są poprzez zewnętrzne białka - reduktazę NADPH-adrenodoksyna i adrenodoksynę. (Manikandan i Nagini 2018; Zhao i in. 2021; Machalz i in. 2021). Charakterystyczne właściwości spektralne P450 są widoczne podczas wiązania z nim substratów, a mianowicie wzrasta absorbancja przy λ 390 nm i spada przy λ 420 nm, co można ustalić wykonując tzw. widmo różnicowe typu I, natomiast w przypadku substratów wiążących się bezpośrednio z żelazem hemowym widmo różnicowe typu II (maksimum przy 430 nm i minimum przy 390 nm). W przypadku stabilnych kompleksów substrat enzym reakcja daje klasyczne widmo różnicowe CO z maksimum przy 450 nm, którą hamuje działanie tlenku węgla (uzyskiwanego na drodze reakcji chemicznej). W zależności od rodzaju CYP może różnić się działanie hamujące tlenku węgla (Ortiz de Montellano 2005).

Wiele związków chemicznych, które ulegają biotransformacji przy udziale cytochromu P450 do reaktywnych form przejściowych, determinuje lub nasila ich mutagenne lub rakotwórcze działanie, prowadząc do dysfunkcji komórki, a w konsekwencji również do kancerogenezy. Przykładem może być niekancerogenny benzo(a)piren (składnik dymu papierosowego, dymów przemysłowych, spalin, zwęglonego mięsa), którego hydroksylowe pochodne są silnie kancerogenne (Guengerich 2017).

Poszczególne izoenzymy CYP mogą być transkrypcyjnie aktywowane przez różne ksenobiotyki (leki, kancerogeny oraz związki zanieczyszczające środowisko) i substraty endogenne (nienasycone i nasycone kwasy tłuszczowe, eikozanoidy, sterole, steroidy, witaminy) poprzez mechanizmy zależne od receptora AhR (indukuje on ekspresję ludzkich CYP1A1, CYP1A2 i CYP1B1) i wielu innych (PXR receptor pregnanu X, CAR konstytutywny receptor androstanu, RXR receptor retinoidu X, VDR receptor witaminy D, RAR receptor kwasu retinowego, GR receptor glikokortykoidów). Ligandami AhR są głównie dioksyny, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (benzopiren) i polichlorowane bifenyle, które jako kancerogeny mogą powodować większy stopień uszkodzeń DNA u osobników z podwyższonym poziomem CYP1A. Natomiast PXR, jak i CAR są czynnikami transkrypcyjnymi biorącymi udział w regulacji ekspresji izoform cytochromu P450, szczególnie z podrodziny CYP3A (Manikandan i Nagini 2018). Izoenzymy CYP ulegają specyficznej tkankowej ekspresji tworząc zróżnicowany profil enzymów CYP w poszczególnych tkankach i narządach.

Izoenzymy cytochromów P450 należą do 18 rodzin i 43 podrodzin, i są kodowane są przez 57 genów *CYP* i 58 pseudogenów. Liczba po skrócie oznacza rodzinę genów, wielka litera wskazuje podrodzinę i kolejna cyfra indywidualny gen (geny pisze się kursywą). Geny *CYP* wykazują wysoki stopień zmienności międzyosobniczej regulowanej przez różne mechanizmy genetyczne, niegenetyczne i epigenetyczne, w tym mikroRNA (Jin i Zhong 2023; Caudle i in. 2020; Manikandan i Nagini 2018; Rieger i in. 2013). Podlegają one zjawisku polimorfizmu genetycznego polegającemu na występowaniu w danej populacji dwóch lub więcej form danego genu co w sposób wyraźny wpływa na właściwości produktu danego genu. Powszechną przyczyną zmiany struktury DNA są mutacje punktowe tzw. SNP (ang. *Single Nucleotide Polymorphism*), polegające na zmianie jednego lub kilku nukleotydów w łańcuchu DNA, co prowadzi do powstania różnych alleli określonego genu i w konsekwencji zróżnicowanej aktywności enzymu (He i Feng 2015). Wszystkie kluczowe dla biotransformacji leków izoenzymy cytochromu P450, tj. CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 oraz CYP3A4, występują w kilku odmianach polimorficznych. Jednym z najlepiej poznanych jest polimorfizm izoenzymu CYP2D6. Znalezione około 140 różnych odmian polimorficznych tego enzymu (Caudle i in. 2020).

Międzyosobnicze zmiany metabolizmu leków za pośrednictwem CYP mogą zachodzić w następujących przypadkach: ontogenezy, gdy zmiany rozwojowe ekspresji *CYP* powstały u osobników od noworodków do dorosłych, zwiększonej aktywności enzymów CYP wywołanej leczeniem farmakologicznym, zwiększonej aktywności enzymów CYP w wieku dorosłym wywołanym leczeniem farmakologicznym w wieku noworodkowym oraz zmniejszonej aktywności enzymów CYP u osób z polekowym uszkodzeniem wątroby (Jin i Zhong 2023). Badania kliniczne pozwoliły na identyfikację kilku mikroRNA regulujących CYPy, a mianowicie dla *CYP1A1* np. miR-132, miR-142-3p, miR-21, *CYP2A6* np. miR-142-3p, miR-21, *CYP2C19* np. miR-130b, miR-185, miR-34a i *CYP2E1* np. miR-10a, let-7g, miR-200c, które mogą być przyczyną negatywnych zmian poziomu białka i/lub jego aktywności (Rieger i in. 2013).

3. Biomedyczne właściwości cytochromu P450

Enzymy P450 metabolizują wiele tysięcy endogennych i egzogennych substancji chemicznych w organizmie ludzkim. Niektóre z nich metabolizują tylko jeden substrat, tak jak aromataza, czyli *CYP19A1*, inne kilka substratów, tak jak *CYP5A1*, a inne mogą metabolizować wiele substratów tak jak *CYP 1 - 3* (wiele leków, ksenobiotyków i innych związków chemicznych). Cechy te są odpowiedzialne za ich główne znaczenie w medycynie. Enzymy cytochromu P450 katalizują przemiany wielu endobiotyków: cholesterolu, steroidów i lipidów (kwasy tłuszczowe, kwas arachidonowy, prostacykliny, tromboksany) oraz witamin. Niedobory lub nadmiary tych związków wpływają na prawidłowe działanie organizmu ludzkiego (Caudle i in. 2020; Manikandan i Nagini 2018; Fan i in. 2015).

Enzymy cytochromu P450 odgrywają ważną rolę w steroidogenezie, czyli syntezie hormonów steroidowych (Guengerich i in. 2016). Synteza ich zachodzi w korze nadnerczy, jajnikach, jądrze i tkance tłuszczowej. Ponadto, są kluczowymi czynnikami regulującymi różnorodne procesy fizjologiczne w organizmach zwierzęcych, w tym u człowieka. Do głównych hormonów steroidowych należą kortyzol, aldosteron, testosteron, progesteron i estrogeny (Manikandan i Nagini 2018). Cytochrom P450 odgrywa istotną rolę na wielu etapach syntezy hormonów steroidowych. Na przykład w korze nadnerczy, enzym *CYP11A1* jest kluczowym enzymem konwertującym cholesterol w prekursor hormonalny – pregnenolon, a w kolejnych etapach inne izoenzymy CYP prowadzą do ostatecznej produkcji kortyzolu, aldosteronu i innych hormonów. *CYP11B1* bierze udział w konwersji progesteronu do kortyzolu w korze nadnerczy (mutacje w tym genie skutkują wrodzonym przerostem nadnerczy z powodu niedoboru 11-beta-hydroksylazy). *CYP11B2* wykazuje aktywność 18-hydroksylazy steroidowej w syntezie aldosteronu i 18-oksokortyzolu, a także 11 beta-hydroksylazy steroidowej (mutacje w tym genie skutkują niedoborem metylooksydazy kortykosteronu). *CYP17A1* to kluczowy enzym w szlaku steroidogennym, który wykazuje aktywność 17alfa-hydroksylazy i 17, 20-liazy wytwarzając progestyny, mineralokortykoidy, glukokortykoidy, androgeny i estrogeny (mutacje w tym genie są związane z niedoborem tych enzymów, pseudohermafrodytyzmem i przerostem nadnerczy). *CYP21A2* hydroksyluje steroidy w pozycji 21, jego aktywność jest niezbędna do syntezy hormonów steroidowych, w tym kortyzolu i aldosteronu (mutacje w tym genie powodują wrodzony przerost nadnerczy). W tkankach gonad, takich jak jajniki i jądra, *CYP19A1* (aromataza) odgrywa kluczową rolę w przekształcaniu androgenów, takich jak testosteron, w estrogeny, takie jak estradiol. Enzym ten jest szczególnie istotny u kobiet, ponieważ to właśnie w jajnikach następuje głównie produkcja estrogenów (Guengerich i in. 2016; Miller i Auchus, 2011). W procesach biotransformacji pochodne 2-hydroksy estrogenów powstają przy udziale cytochromu *CYP1A1* lub *CYP1A2*. Pochodne 4-hydroksy powstają przy udziale cytochromu *CYP1B1* i *CYP3A4*, a ich głównym miejscem wytwarzania są narządy estrogenozależne (endometrium, gruczoł piersiowy, jajnik) (He i Feng 2015).

Wielonienasycone kwasy tłuszczowe są kluczowymi składnikami błon komórkowych i pełnią ważne funkcje w organizmach. Dwa główne rodzaje wielonienasyconych kwasów tłuszczowych to kwasy omega-3 (np. kwas alfa-linolenowy) i kwasy omega-6 (np. kwas linolowy). Przyjmowanie odpowiedniej ilości tych kwasów tłuszczowych jest kluczowe dla utrzymania zdrowia. Cytochrom P450 odgrywa istotną rolę w ich metabolizowaniu w organizmach. Szczególnie ważne są enzymy z rodziny CYP4, które biorą udział w ich konwersji do metabolitów. *CYP4A* katalizuje

utlenianie kwasów omega-6, podczas gdy CYP4F jest odpowiedzialny za metabolizm kwasów omega-3. Te reakcje enzymatyczne są kluczowe dla utrzymania równowagi między różnymi klasami wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, co ma wpływ na procesy zapalne, odpowiedź immunologiczną, regulację ciśnienia krwi i inne procesy fizjologiczne. Enzymy cytochromu P450 odgrywają ważną rolę w metabolizowaniu wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (WKT) do eikozanoidów i/lub metabolizowaniu ich do mniej aktywnych metabolitów lub nieaktywnych produktów (Guengerich i in. 2016). Biorąc w nich udział CYP1A1, CYP1A2 I CYP2E1, które metabolizują endogenne WKT do sygnałowych cząsteczek, na przykład kwas arachidonowy do kwasu 19-hydroksyeikozatetraenowego, kwas eikozapentaenowy do kwasów epoksyekozatetraenowych oraz kwas dokozaheksaenowy do kwasów epoksydokozaapentaenowych. Ponadto, w metabolizmie WKT biorą udział CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19, CYP2J2, CYP2S1, CYP3A4, CYP4A11, CYP4F2, CYP4F3A, CYP4F3B, CYP4F8 i CYP4F12. CYP4F11 dezaktywuje lub zmniejsza aktywność tych cząsteczek sygnałowych (Bishop-Bailey i in. 2014; Guengerich i in. 2016). Kwasy tłuszczowe o długości 28 lub więcej atomów węgla ω -hydroksyluje CYP4F22. Te długie cząsteczki mają kluczowe znaczenie dla tworzenia i utrzymywania funkcji bariery wodnej skóry (mutacje tego genu są związane z podtypem blaszkowatej rybiej łuski wrodzonej erytrodemii u ludzi) (Nohara i in. 2021).

Wiele innych kluczowych związków organizmu ludzkiego jest syntezowanych i metabolizowanych poprzez enzymy CYP. Zdolność cytochromów P450 do metabolizowania dużej liczby różnych związków wynika z liczby różnych izoform CYP, a także z powodu tego, że wiele izoenzymów charakteryzuje się specyficznością substratową. W zależności od metabolizowanego związku chemicznego jego masy molowej można przewidzieć cytochrom P450, który weźmie w nim udział (Olsen i in. 2015). Największą ilość związków chemicznych (w tym leków) metabolizowanych jest przez CYP3A4, aż 60 % leków obecnych na rynku farmaceutycznym. Pomiedzy wieloma z nich zachodzą interakcje, które mogą prowadzić do hamowania lub indukcji CYP (Hakkola i in. 2020; Klyushova i in. 2022).

Biorąc pod uwagę całkowity metabolizm w jakim enzymy cytochromu P450 biorą udział, to w 75% dotyczy to metabolizmu leków polegającego na przekształceniu w hydroksy pochodne ułatwiające ich wydalanie z organizmu a w przypadku niektórych bioaktywacja (np. klopidrogel lub kodeina) (Zhao i in. 2021).

4. Hamowanie i indukcja CYP

Hamowanie lub indukcja enzymów CYP to główny mechanizm interakcji lek-lek, wpływający bezpośrednio na farmakokinetykę farmaceutyków. Oddziaływanie na procesy farmakokinetyczne bezpośrednio koreluje ze skutecznością i powodzeniem farmakoterapii, przy czym ostateczna odpowiedź na lek u pacjenta może się jednak różnić z uwagi na występowanie polimorfizmu genów kodujących CYP. Zjawisko to sprawia, że przewidywanie interakcji lekowych u indywidualnych pacjentów nie jest wcale takie proste, a utrudnia je ponadto fakt, że wpływ na CYP mają nie tylko leki, ale również zioła, żywność czy ksenobiotyki środowiskowe (Tab.1). Znaczna ilość interakcji farmakokinetycznych dotyczy zmiany w aktywności izoformy CYP3A4, która odpowiada za metabolizm nawet 55% wszystkich farmaceutyków. Należy mieć jednak na uwadze fakt, iż interakcje lek-lek czy lek-żywność wykryte *in vitro* nie zawsze występują lub mają znaczenie kliniczne *in vivo* (Petric i in. 2021).

Inhibicja enzymów CYP może być odwracalna lub nieodwracalna, przy czym odwracalną można podzielić na kompetycyjną i niekompetycyjną. Inhibicja kompetycyjna występuje częściej i polega na współzawodnictwie inhibitora i substratu o miejsce wiązania w centrum aktywnym enzymu. Hamowanie niekompetycyjne opiera się natomiast na wiązaniu inhibitora w miejscu innym, niż centrum aktywne. Wyróżnia się ponadto tzw. inhibicję „samobójczą”, w której inhibitor stanowi wysoce reaktywny metabolit pośredni, powstały w wyniku przekształcenia substratu przez enzym CYP. W tym przypadku inaktywacja enzymu może zachodzić poprzez kowalencyjne wiązanie się inhibitora z resztami aminokwasowymi w apoproteinie czy też poprzez alkilację lub aryłację reszty hemowej, prowadzących do zniszczenia hemu. Produkty rozpadu tej grupy prostetycznej także mogą kowalencyjnie modyfikować apoproteinę. Mechanizm indukcji enzymów CYP jest nieco

bardziej złożony i ma charakter głównie transkrypcyjny. Biorą w nim udział czynniki transkrypcyjne, takie jak receptor węglowodorów aromatycznych (AhR), oraz receptory jądrowe sierocce, wśród których znaczenie w kontekście biotransformacji ksenobiotyków mają konstytutywny receptor androstanu (CAR) i receptor pregnanu X (PXR) (Guengerich 2017). AhR reguluje ekspresję genów izoform CYP1A1, CYP1A2 i CYP2B1, CAR genów podrodziny CYP2B i izoform CYP3A4, CYP2C8 i CYP2C9, a PXR genów podrodzin CYP2B, CYP2C i CYP3A (Manikandan i Nagini 2018).

Z uwagi na to, że enzymy CYP znajdują się m.in. w enterocytach i hepatocytach, wpływ inhibitorów i induktorów będzie skutkował zmianami w absorpcji i eliminacji leku. Inhibicja enzymów w enterocytach wpłynie na zwiększenie biodostępności leku podanego doustnie i tym samym zwiększenie pola powierzchni pod krzywą zmian stężenia farmaceutyku w czasie (ang. *area under the curve*, AUC). Przykładem takiego inhibitora jest itrakonazol, który poprzez hamowanie aktywności CYP3A4 zmienia farmakokinetykę midazolamu. Inhibicja enzymów w hepatocytach wpłynie z kolei na zwiększenie takich parametrów farmakokinetycznych, jak AUC, stężenie maksymalne leku (C_{max}) i biologiczny okres jego półtrwania ($t_{0,5}$). Taki efekt, wywołany hamowaniem aktywności CYP1A2 przez fluwoksaminę, obserwowany jest w przypadku kofeiny. Indukcja enzymów CYP będzie skutkować efektem odwrotnym, tj. zmniejszeniem wymienionych parametrów. Przykładem induktora może być ryfampicyna, która poprzez wpływ na aktywność CYP3A4 w enterocytach hamuje absorpcję alfentanylu, a w hepatocytach hamuje eliminację nifedypiny (Roberts i Gibbs 2018).

Tab.1. Przykłady induktorów i inhibitorów dla wybranych izoform CYP (Petric i in. 2021; Roberts i Gibbs 2018; Hakkola i in. 2020).

Izoforma CYP	Inhibitory	Induktory
CYP3A4	itrakonazol, ketokonazol, werapamil, erytromycyna, klarytromycyna, rytonawir, naryngenina (sok grejpfrutowy)	karbamazepina, fenobarbital, ryfampicyna, deksametazon, hiperforyna (dziurawiec zwyczajny), kwercetyna (miłorząd japoński, herbata)
CYP2D6	fluoksetyna, chinidyna, paroksetyna	brak znanego induktora
CYP2C9	amiodaron, flukonazol, metronidazol, sok żurawinowy	karbamazepina, fenobarbital, ryfampicyna, hiperforyna (dziurawiec zwyczajny)
CYP2E1	klometiazol, disulfiram	etanol, izoniazyd
CYP1A2	fluwoksamina, enoksacyna, cyprofloksacyna	karbamazepina, fenobarbital, ryfampicyna, omeprazol, resweratrol (winogrona, czerwone wino, orzeszki ziemne), tytoń, kawa, mięso grillowane lub smażone na patelni

5. Podsumowanie

Cytochrom P450 jest istotną rodziną enzymów odgrywającą kluczową rolę w syntezie hormonów steroidowych, metabolizowaniu wielonienasyconych kwasów tłuszczowych oraz przemianie leków w organizmie. Ich różnorodna funkcja sprawia, że są ważnymi celami zarówno w medycynie, jak i farmakologii. Badania nad tymi enzymami są niezmiernie ważne dla rozwoju nowych terapii farmakologicznych i lepszej opieki zdrowotnej. Stanowi on również fascynujący obszar badań naukowych, który ma kluczowe znaczenie dla zrozumienia procesów biochemicznych w organizmie ludzkim. Jego rola w syntezie hormonów steroidowych, metabolizowaniu kwasów tłuszczowych i metabolizmie leków jest niezwykle ważna dla utrzymania zdrowia i skuteczności terapii farmakologicznych. Zrozumienie właściwości i mechanizmów działania cytochromu P450 jest kluczowe dla rozwoju skuteczniejszych terapii farmakologicznych oraz lepszej diagnostyki chorób

związanych z zaburzeniami metabolizmu hormonów steroidowych i kwasów tłuszczowych. Badania nad regulacją ekspresji tych enzymów oraz identyfikacją ich substratów i produktów reakcji mają duże znaczenie zarówno dla medycyny, jak i farmakologii. Odkrycie zmienności genetycznej w tych enzymach pozwala lepiej zrozumieć, dlaczego niektórzy pacjenci reagują inaczej na określone leki, a także jak dostosować dawkowanie w celu uzyskania najlepszych efektów terapeutycznych. Odkrywane mutacje w tych genach pozwalają na lepsze zrozumienie wielu chorób, które dotychczas były leczone tylko objawowo. Dalsze badania nad tą nadrodziną genów/enzymów mogą pomóc rozwijać coraz lepsze strategie terapeutyczne i zwiększać jakość opieki medycznej.

6. Literatura

- Bishop-Bailey D, Thomson S, Askari A, et al. (2014) Lipid-metabolizing CYPs in the regulation and dysregulation of metabolism. *Annuals Review of Nutrition* 34: 261-279.
- Caudle KE, Sangkuhl K, Whirl-Carrillo M, et al. (2020) Standardizing CYP2D6 genotype to phenotype translation: consensus recommendations from the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium and Dutch Pharmacogenetics Working Group. *Clinical and Translational Science* 13, 116–124.
- Fan F, Muroya Y, Roman RJ (2015) Cytochrome P450 eicosanoids in hypertension and renal disease. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 24(1): 37-46.
- Guengerich FP (2017) Intersection of the roles of cytochrome P450 enzymes with xenobiotic and endogenous substrates: relevance to toxicity and drug interactions. *Chemical Research in Toxicology* 30(1): 2-12.
- Guengerich FP, Waterman MR, Egli M (2016) Recent structural insights into cytochrome P450 function. *Trends in Pharmacological Sciences* 37(8): 625-640.
- Hakkola J, Hukkanen J, Turpeinen M, et al. (2020) Inhibition and induction of CYP enzymes in humans: an update. *Archives in Toxicology* 94: 3671–3722.
- He X, Feng S (2015) Role of metabolic enzymes P450 (CYP) on activating procarcinogen and their polymorphisms on the risk of cancers. *Current Drug Metabolism* 16(10): 850-863.
- Jin J, Zhong XB (2023) Epigenetic mechanisms contribute to intraindividual variations of drug metabolism mediated by cytochrome P450 enzymes. *Drug Metabolism and Disposition* 51(6): 672-684.
- Klyushova LS, Perepechaeva ML, Grishanova AY (2022) The role of CYP3A in health and disease. *Biomedicines* 10(11): 2686.
- Nohara T, Ohno Y, Kihara A (2021) Impaired production of the skin barrier lipid acylceramide by CYP4F22 ichthyosis mutations. *Journal of Dermatological Sciences* 101(1): 69-71.
- Machalz D, Pach S, Bermudez M, et al. (2021) Structural insights into understudied human cytochrome P450 enzymes. *Drug Discovery Today* 26(10): 2456-2464.
- Manikandan P, Nagini S (2018) Cytochrome P450 structure, function and clinical significance: a review. *Current Drug Targets* 19(1): 38-54.
- Miller WL, Auchus RJ (2011) The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine Reviews* 32(1): 81-151.
- Olsen L, Oostenbrink C, Jørgensen FS (2015) Prediction of cytochrome P450 mediated metabolism. *Advanced Drug Delivery Reviews* 86: 61-71.
- Ortiz de Montellano PR (2005) *Cytochrom P450: struktura, mechanizm i biochemia* (wyd. 3). Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York.
- Petric Z, Žuntar I, Putnik P, Bursać Kovačević D (2021) Food–drug interactions with fruit juices. *Foods* 10(1): 33.
- Rieger JK, Klein K, Winter S, et al. (2013) Expression variability of absorption, distribution, metabolism, excretion-related microRNAs in human liver: influence of nongenetic factors and association with gene expression. *Drug Metabolism and Disposition* 41(10): 1752-1762.
- Roberts AG, Gibbs ME (2018) Mechanisms and the clinical relevance of complex drug–drug interactions. *Clinical Pharmacology: Advances and Applications* 10: 123-134.
- Zhao M, Ma J, Li M, Zhang Y, et al. (2021) Cytochrome P450 enzymes and drug metabolism in humans. *International Journal of Molecular Sciences* 22(23): 12808.

10. Pilotażowe spektroskopowe badania oddziaływań wybranej substancji o potencjalnym działaniu antyproliferacyjnym z HSA i AGP. Badania *in vitro*

Pilot spectroscopic studies of the interaction of selected substance with a potential antiproliferative activity with HSA and AGP. *In vitro* studies

Trzepacz Monika⁽¹⁾, Owczarzy Aleksandra⁽²⁾, Kulig Karolina⁽²⁾, Rogóż Wojciech⁽²⁾, Maciążek-Jurczyk Małgorzata⁽²⁾

⁽¹⁾ Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Farmacji Fizycznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

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

Małgorzata Maciążek-Jurczyk: mmaciazek@sum.edu.pl

Słowa kluczowe: spektrofлуorymetria, spektroskopia UV-Vis, dichroizm kołowy, albumina surowicy ludzkiej, $\alpha 1$ kwaśna glikoproteina

Streszczenie

W Polsce choroby nowotworowe stanowią drugą najczęstszą przyczynę zgonów, a ze względu na duże narażenie populacji na kancerogeny związane z globalizacją, rozwijającą się gospodarką i stylem życia oraz starzenie się społeczeństwa, liczba zachorowań będzie systematycznie rosnać. Mimo obecności wielu leków przeciwnowotworowych oraz postępu radioterapii i leczenia chirurgicznego, konieczna jest optymalizacja leczenia oraz poszukiwanie nowych substancji o właściwościach antyproliferacyjnych.

Głównym celem było wykonanie wstępnych badań polegających na spektroskopowej ocenie zdolności wiązania Salt3 – substancji o potencjalnym działaniu antyproliferacyjnym z białkami transportującymi osocza – albuminą surowicy ludzkiej (HSA) oraz $\alpha 1$ kwaśną glikoproteiną (AGP). Ponadto oszacowano zmiany struktury drugo- i trzeciorzędowej zastosowanych białek w obecności Salt3. Jako techniki badawcze zastosowano spektrofлуorescencję, spektrofotometrię UV-VIS i spektroskopię dichroizmu kołowego (CD).

Na podstawie przeprowadzonych wstępnych badań stwierdzono, iż Salt3 w niewielkim stopniu wiąże się z cząsteczką HSA oraz AGP (stałe asocjacji rzędu 10^4 [mol⁻¹ L]), co może powodować zarówno silny efekt terapeutyczny, jak i toksyczny. Nie zarejestrowano także wpływu badanej substancji na zmiany w strukturze drugo- i trzeciorzędowej, co może mieć pozytywne znaczenie w aspekcie utrzymania prawidłowego funkcjonowania białek. Stwierdzono słuszność przeprowadzenia pilotażowych badań z koniecznością rozszerzenia ich o analizy innych białek transportujących surowicy krwi np. γ globulinę ludzką (HGG) oraz porównania danych z wartościami uzyskanymi dla surowicy kontrolnej normalnej (CNS).

1. Wstęp

Liczba zachorowań na nowotwory stale wzrasta. W 2020 roku odnotowano na całym świecie 19,3 miliona nowych przypadków i około 10,0 milionów zgonów spowodowanych tą chorobą (Sung, Ferlay, Siegel i in. 2021). W Polsce nowotwory stanowią drugą najczęstszą przyczynę zgonów. Z danych Krajowego Rejestru Nowotworów wynika, że w 2019 roku odnotowano prawie 171,2 tysiąca nowych zachorowań na nowotwory złośliwe i aż 100,3 tysiąca zgonów (Didkowska, Wojciechowska, Michalek i in. 2022). Ze względu na duże narażenie populacji na kancerogeny związane z globalizacją, rozwijającą się gospodarką i stylem życia oraz starzenie się społeczeństwa, liczba zachorowań będzie systematycznie rosnać. Przewiduje się, że globalne obciążenie nowotworami w 2040 roku wyniesie 28,4 miliona przypadków, co oznacza wzrost o 47% w stosunku do roku 2020 (Sung, Ferlay, Siegel i in. 2021). Mimo obecności wielu leków przeciwnowotworowych

oraz postępu radioterapii i leczenia chirurgicznego, konieczna jest optymalizacja leczenia oraz poszukiwanie nowych substancji o właściwościach antyproliferacyjnych. Związane jest to z licznymi skutkami ubocznymi leczenia konwencjonalnego, w szczególności związanych z chemioterapią. Spowodowane jest to dużą inwazyjnością cytostatyków oraz brakiem ich wybiórczego działania. Ponadto komórki nowotworowe są wysoce odporne na czynniki antywzrostowe, posiadają dużą zdolność do unikania apoptozy, cechują się przedłużoną angiogenezą, niekontrolowaną proliferacją, inwazyjnością oraz przerzutami (Pathania, Millard, Neamati 2009).

Albumina surowicy ludzkiej (HSA) jest najobficiej występującym białkiem w surowicy i pełni wiele funkcji biologicznych, do których należy między innymi transport związków endo- i egzogennych. W cząsteczce HSA znajdują się dwa miejsca o charakterystycznej budowie i dużym powinowactwie do liganda zwane miejscami Sudlowa I i II. Pierwsze miejsce Sudlowa znajduje się w subdomenie IIA, podczas gdy drugie miejsce Sudlowa w subdomenie IIIA. Subdomena IIA ma postać kieszeni, w środku której zlokalizowana jest m.in. pojedyncza reszta tryptofanowa Trp-214. W swoim centrum wiąże kwasy dikarboksyłowe i duże heterocykliczne ujemnie naładowane cząsteczki. W subdomenie IIA wiązaniom leków towarzyszą oddziaływania hydrofobowe. Subdomena IIIA to miejsce wiązania, w którym ligandy alifatyczne lub aromatyczne kwasy karboksylowe wiążą się z ujemnie naładowaną grupą kwasową na końcu cząsteczki, z daleka od jej centrum hydrofobowego. Zlokalizowane są tam m.in. trzy reszty tyrozylowe, tj. Tyr-401, Tyr-411, Tyr-497. Wiązanie leków w subdomenie IIIA umożliwiają oddziaływania hydrofobowe i elektrostatyczne oraz wiązania wodorowe (Maciążek-Jurczyk, Morak-Młodawska i in. 2021). Aby określić miejsca wiązania w cząsteczce albuminy surowicy ludzkiej, jako markery miejsca wiązania stosuje się dansylowane aminokwasy (DNSA). Związki te lokalizują się w miejscach wiązania HSA i wykazują aktywność fluorescencyjną, która wynika z budowy aminokwasu (Owczarzy, Rogóż, Kulig i in. 2023). Dansyl-L-glutamina (dGlu) oraz dansyl-L-glicyna (dGly) to markery fluorescencyjne wiążące się z pierwszym miejscem Sudlowa, natomiast miejscem wiązania dansyl-L-proliny (dPro) i dansyl-L-feniloalaniny (dPhe) jest drugie miejsce Sudlowa.

$\alpha 1$ kwaśna glikoproteina (orosomukoid, AGP), należy do białek ostrej fazy. Dodatkowo jest białkiem nośnikowym, wiąże i transportuje substancje lecznicze o charakterze obojętnym i zasadowym. Zbudowana jest z β -baryłki otoczonej α -helisą, która tworzy kieszeń wiążącą ligandy. W pobliżu wejścia do kieszeni zlokalizowane są m.in. dwie reszty argynylowe, Arg-68 oraz Arg-90. Ich dodatni ładunek elektryczny umożliwia wiązanie ligandów posiadających ujemny ładunek elektryczny. Złożona struktura szczeliny wiążącej ligandy umożliwia tworzenie potrójnego kompleksu, poprzez wiązanie jednocześnie nawet dwóch cząsteczek leków. Markerem miejsca wiązania dla cząsteczki AGP jest czerwień chinaldynowa – związek o charakterze alkalicznym, który w postaci niezwiązanej charakteryzuje się niską emisją promieniowania. Po związaniu z AGP fluorescencja znacznie wzrasta (Owczarzy, Zięba, Pożycka i in. 2021).

Chlorek 9-amino-5-metylo-12(H)-chino[3,4-b][1,4]benzotiazyny (Salt3) jest jedną z nowo zsyntetyzowanych substancji o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym, której właściwości antyproliferacyjne zostały przebadane *in vitro* przy użyciu linii komórkowej raka jelita grubego HCT 116 (HCT 116) oraz raka płuc Lewisa (LLC). Aktywność antyproliferacyjna Salt3 wynosi IC_{50} $5,1 \pm 1,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ względem HCT 116 oraz $8,9 \pm 2,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ względem LLC (Zięba, Sochanik, Szurko i in. 2010).

Analizę oddziaływań pomiędzy danym białkiem a badanym związkiem (ligandem) umożliwia poprzez ocenę zmian intensywności emisyjnych widm fluorescencyjnych i widm absorpcyjnych wynikających z obecności badanego liganda spektrofotometria UV-VIS. Druga pochodna widm różnicowych jest użytecznym parametrem w ocenie zmian zachodzących w środowisku aminokwasów aromatycznych w układzie badanego związku, natomiast spektroskopia dichroizmu kołowego (CD) pozwala ocenić zmiany zachodzące w drugorzędowej strukturze białka w obecności liganda.

Powszechnie wiadomo, iż leki przeciwnowotworowe wykazują znaczną szkodliwość, dlatego konieczne jest określenie ich toksyczności oraz dawki terapeutycznej. Aby uzyskać te informacje, głównym celem było wykonanie badań pilotażowych polegających na spektroskopowej ocenie zdolności wiązania Salt3 z potencjalnymi białkami transportującymi osocza – albuminą

surowicy ludzkiej (HSA) oraz α_1 kwaśną glikoproteiną (AGP) oraz zmian struktury drugo- i trzeciorzędowej zastosowanych białek w obecności Salt3 przy użyciu technik spektroskopowych takich jak: spektrofluorescencja, spektrofotometria UV-VIS i dichroizm kołowy (CD).

2. Materiały i Metody

2.1 Materiały

Albumina surowicy ludzkiej (HSA), frakcja V, dansyl-L-fenylalanina (dPhe) oraz dansyl-L-glutamina (dGlu) zostały zakupione w firmie MP Biomedicals, α_1 kwaśna glikoproteina (AGP), dansyl-L-glicyna (dGly) oraz czerwień chinaldynowa (QR) pochodzą z firmy Sigma – Aldrich a dansyl-L-prolina (dPro) z Fluka Biochemika. Synteza chlorku 9-amino-5-metylo-12(H)-chino[3,4-b][1,4]benzotiazyny (Salt3) została wykonana w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej Wydziału Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach.

2.2 Metody

Emisyjne widma fluorescencyjne badanych układów Salt3-HSA, Salt3-AGP, Salt3-DNSA-HSA oraz Salt3-QR-AGP w stosunku molowym odpowiednio 0:1:1-10:1:1 oraz 0:1:1-10:1:1 i 0:1:0,5-10:1:1 zarejestrowano za pomocą spektrofluorymetru JASCO FP-6500. Celem wzbudzenia fluorescencji układów Salt3-HSA oraz Salt3-AGP zastosowano długości fali λ_{ex} 275 nm oraz λ_{ex} 295 nm, układu Salt3-DNSA-HSA λ_{ex} 350 nm, a układ Salt3-QR-AGP wzbudzano do fluorescencji długością fali wzbudzenia λ_{ex} 500 nm. Do zarejestrowania zmian intensywności widm absorpcyjnych układów oraz drugiej pochodnej widm różnicowych wykorzystano spektrofotometr UV-VIS Jasco V-530. Efekt wewnętrzznego filtra (IFE, ang. *inner filter effect*) uwzględniono korygując fluorescencję (Kirby 1971).

W celu określenia statycznego i/lub dynamicznego charakteru oddziaływań pomiędzy białkiem a badanym związkem wykorzystano równanie Sterna-Volmera (Lakowicz 2006). Korzystając z równania Klotza obliczono stałe asocjacji (K_a [mol^{-1} L]) oraz liczbę klas miejsc wiązania (n) i oszacowano trwałość kompleksu ligand – białko (Lakowicz 2006).

Aby zlokalizować miejsca oddziaływań Salt3 z cząsteczkami badanych białek obliczono procent wyparcia znaczników fluorescencyjnych.

Za pomocą spektropolarymetru CD JASCO J-1500 zarejestrowano widma CD HSA i AGP i oceniono zmiany w strukturze drugorzędowej badanych białek spowodowane obecnością Salt3.

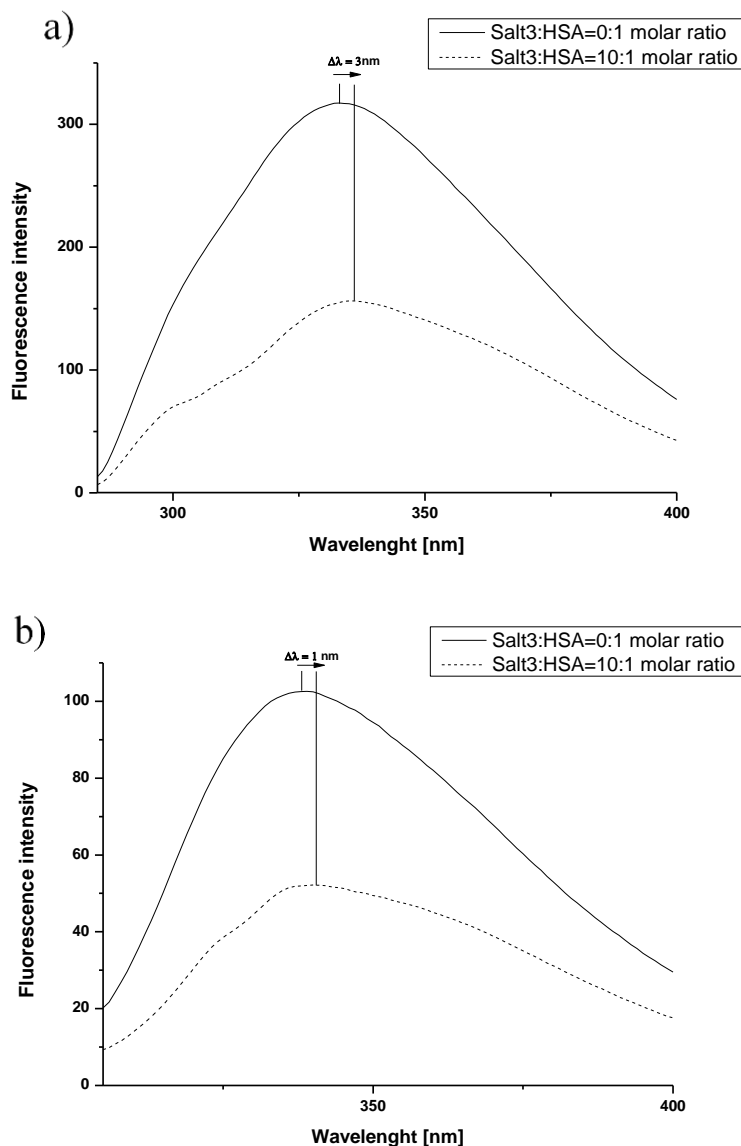
Wszystkie pomiary wykonano w trzech powtórzeniach. Uzyskane dane liczbowe zostały opracowane za pomocą oprogramowania OriginPro w wersji 8,5 SR1 (Northampton, MA, USA) i przedstawione jako średnie arytmetyczne wraz z odchyleniami standardowymi.

3. Wyniki i dyskusja

Na podstawie pilotażowych emisyjnych widm fluorescencyjnych HSA oraz AGP o stężeniu molowym $3 \cdot 10^{-6}$ mol L^{-1} zaobserwowano obniżenie intensywności fluorescencji badanych białek wraz ze wzrostem stężenia Salt3, zarówno dla długości fali wzbudzenia λ_{ex} 275 nm, jak i λ_{ex} 295 nm (Rys.1,2). Dodatkowo zaobserwowano, że maksimum intensywności fluorescencji HSA oraz AGP w obecności Salt3 ulega przesunięciu w kierunku fal długich, co może świadczyć o zmianie środowiska wokół aminokwasów aromatycznych na bardziej hydrofilowe i wpływie związku na strukturę trzeciorzędową badanych makromolekuł.

Korzystając z danych zebranych z pilotażowych emisyjnych widm fluorescencyjnych białek w obecności Salt3 wykreślono krzywe wygaszania fluorescencji HSA oraz AGP. Zaobserwowano, że wraz ze wzrostem stężenia Salt3 dochodzi do wygaszania intensywności fluorescencji badanych białek. Silniejsze wygaszanie fluorescencji w obecności Salt3 o wzrastającym stężeniu zaobserwowano w przypadku AGP. Wynosiło ono $43,87 \pm 0,32\%$ oraz $44,78 \pm 1,30\%$, odpowiednio dla długości fali wzbudzenia λ_{ex} 275 nm oraz λ_{ex} 295 nm. W przypadku HSA wartości wygaszania były nieco mniejsze i wynosiły $35,85 \pm 2,83\%$ i $35,01 \pm 1,64\%$, dla długości fali wzbudzenia λ_{ex} 275 nm oraz λ_{ex} 295 nm. Może świadczyć to o silniejszym powinowactwie Salt3 do AGP niż HSA.

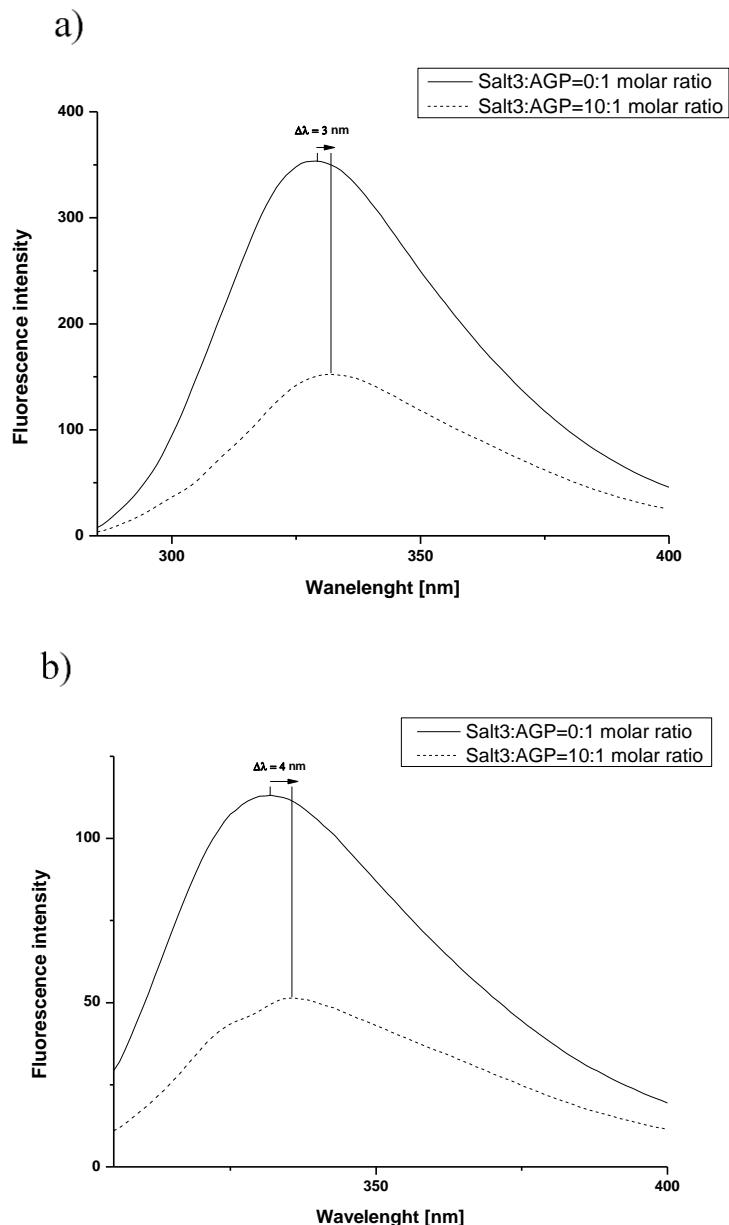
Za pomocą równania Sterna-Volmera wykreślono krzywe Sterna – Volmera dla badanych układów: Salt3-HSA oraz Salt3-AGP i wskazano na statyczny charakter wygaszania fluorescencji HSA oraz AGP w obecności Salt3, świadczący o tworzeniu się kompleksu Salt3-HSA i Salt3-AGP. Aby wstępnie scharakteryzować utworzone kompleksy obliczono stałe asocjacji, których wartość rzędu 10^4 wskazuje na niską trwałość. Nieco wyższe wartości stałej K_a dla AGP niż dla HSA świadczą o tym, iż AGP jest głównym białkiem wiążącym Salt3, a HSA pełni mniej istotną rolę w dystrybucji Salt3 w krwiobiegu. Na podstawie wartości (n) można również wnioskować, że zarówno HSA jak i AGP posiada jedno miejsce wiązania o wysokim powinowactwie do badanej substancji.



Rys.1. Emisyjne widma fluorescencji HSA, bez i w obecności Salt3; a) λ_{ex} 275 nm, b) λ_{ex} 295 nm.

Korzystając ze znaczników fluorescencyjnych będących markerami głównych miejsc wiązania białek wyznaczono miejsca wiązania Salt3 w cząsteczce HSA oraz AGP. Na podstawie zarejestrowanych emisyjnych widm fluorescencyjnych dansylowanych aminokwasów dGlu, dGly,

dPro, dPhe oraz QR, obliczono procent wyparcia znaczników fluorescencyjnych z miejsca wiązania. Zaobserwowano, że Salt3 wypiera znaczniki fluorescencyjne z obu miejsc wiązania w cząsteczce HSA z bardzo podobną siłą, jednak najmniejszy procent wyparcia odnotowano dla dPro. Na podstawie tych informacji można przypuszczać, że Salt3 łączy się z cząsteczką HSA zarówno w subdomenie IIA, jak i IIIA. W cząsteczce AGP nie zaobserwowano istotnych różnic w wartości procentowej wyparcia znacznika z miejsca wiązania, zatem miejsce wiązania QR pokrywa się z miejscem wiązania Salt3 w strukturze AGP.



Rys.2. Emisyjne widma fluorescencji AGP, bez i w obecności Salt3; a) λ_{ex} 275 nm, b) λ_{ex} 295 nm.

Aby ocenić zmiany w strukturze drugorzędowej badanych białek pod wpływem obecności Salt3 posłużono się spektroskopią dichroizmu kołowego (CD). Na podstawie wstępnie zarejestrowanych widm CD dalekiego UV zaobserwowano, że pasmo intensywności HSA, jak i AGP

nie zmienia się w obecności badanej soli, przez co można wnioskować, iż Salt3 nie powoduje destabilizacji struktury drugorzędowej badanych białek. Zaobserwowano również, iż skład procentowy elementów struktury drugorzędowej badanych białek nie zmienia się znacząco w obecności Salt3, a bardzo znikome zmiany zawartości α -helisy i β -kartki w ich strukturze mogą być spowodowane wpływem środowiska na badany układ. Brak wpływu soli na strukturę drugorzędową białek może mieć istotne znaczenie kliniczne, gdyż zaburzona struktura drugorzędowa prowadzi do wszelakich zaburzeń i modyfikacji funkcji biologicznych białek.

Aby potwierdzić wpływ badanej soli na strukturę trzeciorzędową analizowanych białek zarejestrowano drugie pochodne widm różnicowych. Analizując otrzymane widma badanych białek można zaobserwować zmiany w ich przebiegu pod wpływem obecności Salt3 świadczące o wpływie związku na strukturę trzeciorzędową badanych białek oraz zmianę mikrośrodowiska wokół reszt aminokwasów aromatycznych na bardziej hydrofilowe.

4. Wnioski

Przeprowadzone pilotażowe badania spektroskopowe potwierdziły, iż techniki spektroskopowe są skutecznym narzędziem w analizie interakcji nowo zsyntetyzowanych substancji o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym z albuminą surowicy ludzkiej (HSA) oraz α_1 kwaśną glikoproteiną (AGP). Na podstawie przeprowadzonych wstępnych badań można stwierdzić, iż Salt3 w niewielkim stopniu wiąże się z cząsteczką HSA oraz AGP, co może powodować zarówno silny efekt terapeutyczny, jak i toksyczny. Z tego powodu konieczne jest rozszerzenie badań także o inne białka transportujące surowicy krwi np. γ globulinę ludzką (HGG). Dodatkowo otrzymane wyniki należałoby zestawić i porównać z wartościami uzyskanymi dla surowicy kontrolnej normalnej (CNS).

5. Podziękowania

Podziękowania dla Pana dr hab. n. farm. Andrzeja Zięby, prof. SUM, za możliwość wykonania badań z użyciem chlorku 9-amino-5-metylo-12(H)-chino[3,4-b][1,4]benzotiazyny.

Przedstawione badania zostały częściowo sfinansowane z umowy statutowej PCN-2-012/K/2/F, PCN-1-022/K/2/F, PCN-2-030/K/2/F, PCN-2-011/K/2/F (Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach)

6. Literatura

- Didkowska J i in. (2022) Cancer Incidence and Mortality in Poland in 2019. *Scientific Reports* 12: 10875.
- Kirby EP (1971) *Fluorescence Instrumentation and Methodology*, Eds. R.F. Steinem, I. Weinryb, Plenum Press, New York.
- Lakowicz JR (2006) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd Ed. Springer, New York.
- Maciążek-Jurczyk M i in. (2021) The Influence of Oxidative Stress on Serum Albumin Structure as a Carrier of Selected Diazaphenothiazine with Potential Anticancer Activity. *Pharmaceuticals* 14: 285.
- Owczarzy A i in. (2023) Spectroscopic Studies of Quinobenzothiazine Derivative in Terms of the In Vitro Interaction with Selected Human Plasma Proteins: Part 2. *Molecules* 28: 698.
- Owczarzy A, i in. (2021) Spectroscopic Studies of Quinobenzothiazine Derivative in Terms of the In Vitro Interaction with Selected Human Plasma Proteins. Part 1. *Molecules* 26: 4776.
- Pathania D, i in. (2009) Opportunities in Discovery and Delivery of Anticancer Drugs Targeting Mitochondria and Cancer Cell Metabolism. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61: 1250–1275.
- Sung H, i in. (2021) Global Cancer Statistics 2020: Globocan Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 71: 209–249.
- Zięba A, i in. (2010) Synthesis and in Vitro Antiproliferative Activity of 5-Alkyl-12(H)-Quino[3,4-b][1,4]Benzothiazinium Salts. *European Journal of Medicinal Chemistry* 45: 4733–4739.

11. Kolagen – właściwości fizykochemiczne i zastosowanie biomedyczne

Collagen – physicochemical properties and biomedical application

Wiejak Marta⁽¹⁾, Trzaska Sabina^(1,2), Koch Milena^(1,2), Witek Konrad^(1,2), Lewicka Natalia^(1,2), Śliz Magdalena^(1,2), Ogórek Tiara^(1,2), Janikowska Grażyna⁽³⁾

⁽¹⁾Młoda Farmacja Sosnowiec,

⁽²⁾Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Chemii Analitycznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

⁽³⁾Zakład Chemii Analitycznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec

Marta Wiejak mwiejak3@gmail.com

Słowa kluczowe: kolageny, struktura, konformacje, biomateriał, wykorzystanie.

Streszczenie

Białko zwane kolagenem jest u ssaków rodziną 29 jego typów (od I do XXIX) różniących się strukturą i funkcjami. Każdy z typów posiada co najmniej jedną domenę potrójnej helisy i osadza się w macierzy zewnątrzkomórkowej, gdzie większość z nich tworzy supramolekularne agregaty. Biologicznie białka kolagenowe tworzą włókna, które wpływają na wytrzymałość mechaniczną tkanek i narządów. Większość kolagenów odgrywa strukturalne role i przyczynia się do kształtu tkanek i ich właściwości mechanicznych oraz wewnętrznego zorganizowania. Kolageny oddziałując z kilkoma rodzajami receptorów regulują proliferację, migrację i różnicowanie komórek. Liczne korzystne cechy fizykochemiczne dają możliwości na zastosowanie ich w wielu dziedzinach życia. Dzięki doskonałej zdolności błonotwórczej, biodegradowalności, nietoksyczności i zróżnicowanej budowie, kolagen wykorzystywany jest jako biomateriał w produkcji żywności np. tworzenie opakowań jadalnych, przemyśle farmaceutycznym czy chemicznym a w przyszłości może zostać wykorzystany jako biomateriał w inżynierii tkanki kostnej i in. Wykorzystanie kolagenu jest możliwe ze względu na jego wysoką kompatybilność i porowatość a także łatwość łączenia się z innymi materiałami. Biotechnologia medyczna i farmacja dają możliwości ich zastosowania w medycynie regeneracyjnej przyszłości.

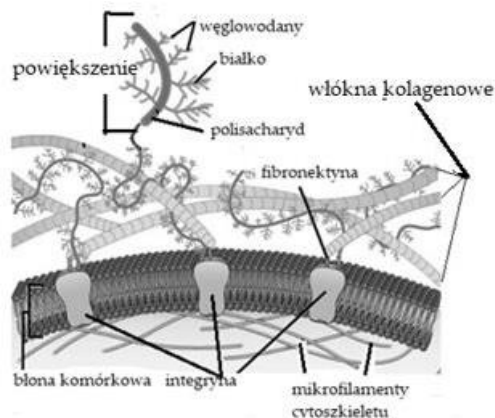
1. Właściwości fizykochemiczne kolagenu

Kolagen jest białkiem posiadającym masę cząsteczki około 300 kilo Daltonów, średnicy około 1,5 nm i długości około 280 nm zbudowanym z trzech łańcuchów polipeptydowych tzw. potrójnej helisy, która składa się z dwóch identycznych łańcuchów ($\alpha 1$) oraz dodatkowego łańcucha, który nieznacznie różni się składem chemicznym ($\alpha 2$). Potrójna helisa kolagenu jest niezbędna dla zachowania prawidłowej struktury kolagenu. Kolagen zbudowany jest z wielu aminokwasów, choć powtarzających się najczęściej trzech aminokwasów glicyny (około 30%), proliny (około 17 %) i hydroksyproliny (około 15 %) o sekwencjach Gly - Pro -X lub Gly-X- Hyp , gdzie X może być dowolną z różnych innych reszt aminokwasowych (Gly – glicyna, Pro - prolina, Hyp - hydroksyprolina). Sekwencje te są znakiem rozpoznawczym wszystkich kolagenów. Cykliczny pierścień proliny wprowadza wgięcia w strukturze kolagenu i umożliwia mu skręcanie się a grupa hydroksylowa hydroksyproliny umożliwia tworzenie wiązań krzyżowych między poszczególnymi łańcuchami. Sekwencyjność i ilość proliny i hydroksyproliny u różnych gatunków jest różna i wpływa na termostabilność kolagenu (Hulmes 2002). Pojedyncza cząsteczka kolagenu ma około 300 nm długości i 1,5 nm średnicy, tworzy nić mającą konformację lewoskrętnej helisy, i może tworzyć agregaty, fibryle o długości około 500 nm. U człowieka łańcuch kolagenu może liczyć od 662 do 3152 reszt aminokwasowych. Gdy trzy lewoskrętne helisy są skręcone razem tworzą prawoskrętną potrójną helisę tzw. super helisę (kooperatywną czwartorzędową strukturę) stabilizowaną tysiącami wiązań wodorowych. Gdy potrójna helisa łączy się w prawoskrętną supersuper-cewkę tworzy się mikrofibryla kolagenowa. Postać ta daje kolagenowi odporność na

działanie większości enzymów proteolitycznych, co jest również związane z jego słabą rozpuszczalnością w wodzie. Białko to może rozpuszczać się w buforze fosforanowym o pH lekko powyżej 7 i obojętnym roztworze chlorku potasu oraz w słabych kwasach organicznych. Jego punkt izoelektryczny mieści się w przedziale pH 6-9. Temperatura jego degradacji u kręgowców mieści się w zakresie od 5 do 50°C i zależy od gatunku oraz zawartości reszt hydroksyproliny i proliny. Kolagen w temperaturze pokojowej wykazuje maksimum absorpcji, przy długości fali 233 nm (Morąg i Burza 2017). Natomiast widma dichroizmu kołowego pokazują największy udział w ujemnych pasmach przy długości fali 191 nm i dodatnim paśmie przy długości fali 221 nm dla helisy α kolagenu. Potrójna helisa kolagenu napromieniowana laserem częściowo przechodzi w strukturę kłębka statycznego. Kolagen charakteryzuje się dużą wytrzymałością na rozciąganie i urazy mechaniczne co zapewniają mu kowalencyjne międzycząsteczkowe wiązania między poszczególnymi podjednostkami. Ponadto, włókienka/agregaty kolagenu zapewniają różne właściwości tkanki w zależności od miejsca ich występowania, ich ilości i kombinacji (Hulmes 2002).

2. Kolagen a komórka

Kolagen jest białkiem kodowanym przez około 44 geny *COL* (ang. *Collagen*), które w zależności od typu są różnie numerowane np. gdy chodzi o typ I dodaje się cyfrę 1 i dla podjednostki alfa1 literę A i cyfrę 1 (np. *COL1A1*). Jest to najstarsze filogenetycznie i jednocześnie najliczniejsze białko występujące w macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM, ang. *extracellular matrix*) w asyście wielu różnego rodzaju białek i węglowodanów. Po uwolnieniu kolagenu z komórki łączy się on w długie włókna kolagenowe przeplatające się z proteoglikanami, które mogą być przymocowane do długiego szkieletu polisacharydowego (Rys. 1).



Rys. 1. Budowa struktur połączeń receptor - kolagen – węglowodany w układzie komórka – macierz zewnątrzkomórkowa (na podstawie <https://openstax.org/books/> wejście 23.07.23).

3. Biosynteza kolagenu

Proces biosyntezy kolagenu to proces wieloetapowy, zachodzi głównie w komórkach fibroblastów, synteza może zachodzić zarówno wewnątrzkomórkowo, jak i zewnątrzkomórkowo. Biosynteza kolagenu rozpoczyna się od siateczki śródplazmatycznej szorstkiej (ER), gdzie dochodzi do transkrypcji genów pro- $\alpha 1$ i pro- $\alpha 2$, następnie powstałe mRNA tłumaczone jest na rybosomach w cytoplazmie, czego efektem jest powstanie preprokolagenu. Preprokolagen zawiera sekwencje sygnałową, która powoduje kierowanie łańcucha z powrotem do siateczki śródplazmatycznej (ER) w celu obróbki potranslacyjnej obejmującej odcięcie peptydu sygnałowego z N-końca łańcucha; hydroksylację reszt lizyny i proliny, katalizowane przez hydroksylazę lizynową i hydroksylazę prolinową, które jako kofaktora wymagają witaminy C, alfa-ketoglutaranu, jonów żelaza (II) i tlenu cząsteczkowego; glikozylację reszt hydroksylizyny glukozą, katalizowane przez

glukozylotransferazy i galaktozą, katalizowane przez galaktozylotransferazy. W wyniku wyżej wymienionych procesów preprokolagen zostaje przekształcony w prokolagen, który samorzutnie przyjmuje strukturę drugorzędową w formie lewoskrętnej alfa helisy, a następnie transportowany jest do aparatu Golgiego, pakowany w pęcherzyki i wydzielany poza komórkę. Poza komórką dochodzi do rozszczepiania prokolagenu w wyniku działania aminoproteiny prokolagenowej i karboksypeptydazy prokolagenowej, które usuwają końce cząsteczki prokolagenu (peptydy ekstensyjne), a cząsteczka staje się tropokolagenem. Cząsteczki tropokolagenu ulegają agregacji z wytworzeniem wiązań poprzecznych między nimi, przy udziale enzymu zależnego od jonów miedzi i witaminy B6 - oksydazy lizynowej, w wyniku czego dochodzi do powstawania włókien kolagenowych (Wu i in. 2022).

Stabilizacja kolagenu odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu prawidłowej struktury tego białka. Helisa kolagenu stabilizowana jest poprzez tworzenie wiązań wodorowych między grupami aminowymi i karboksylowymi różnych aminokwasów, obecność glicyny jako co trzeciej reszty oraz tworzenie międzyłańcuchowych oddziaływań elektrostatycznych.

4. Receptory kolagenowe

Kolagen wykazuje zdolność do wiązania się z określonymi rodzinami receptorów (integryny, receptory domeny dyskoidyny, uPARAP/Endo180, glikoproteina VI), oddziałując w ten sposób na podstawowe funkcje życiowe poszczególnych grup komórek.

Integryny należą do grupy receptorów kolagenowych i zaliczane są do glikoproteinowych receptorów transbłonowych (rycina 1), będących białkami adhezyjnymi. Mają charakter dimerów - w organizmie człowieka wyróżnia się 18 rodzajów podjednostek α oraz 8 rodzajów podjednostek β . Wykazano, że integryny $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$, i $\alpha 11\beta 1$ mają zdolność do wiązania kolagenu typu I i IV z różnym powinowactwem. Integryna $\alpha 1\beta 1$ wykazuje większe powinowactwo do kolagenu typu IV, natomiast integryna $\alpha 2\beta 1$ do kolagenu typu I. Integryna $\alpha 2\beta 1$ pośredniczy w procesie adhezji kolagenu do płytek krwi zależnie od jonów magnezu, przy udziale powierzchniowego kompleksu glikoproteiny Ia-IIa. Receptor ten jest niezbędny do adhezji i aktywacji płytek krwi na monomerycznym kolagenie typu I, natomiast nie gra istotnej roli w przypadku kolagenu włóknistego. Powinowactwo integryny $\alpha 2\beta 1$ do kolagenu podlega regulacji poprzez sygnalizację wewnątrzkomórkową, w której biorą udział niektórzy agoniści płytek krwi m.in tromboksany, czy ADP (adenozynodifosforan). Liczne badania potwierdzają również udział tego receptora w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej stabilizującej skrzeplinę. Ponadto wykryto go również w układzie kostnym, gdzie jest głównym receptorem wiążącym kolagen. Interakcja ta zapewnia adhezję komórki do powierzchni kości, formując szczelną strefę wokół obszaru przeznaczonego do resorpcji, co umożliwia stworzenie środowiska kwaśnego dla osteoklastów, które jest niezbędne do rozpuszczania substancji mineralnych kości (Boraschi-Diaz i in. 2017).

Receptory domeny dyskoidyny - DDR1 oraz DDR2 wiążą kolagen nie integrynowy o strukturze potrójnej helisy. Oba receptory charakteryzuje specyficzność wobec określonych typów kolagenów. DD1 wiąże kolagen typu IV błony podstawnej, a DD2 kolagen typu II i X. Receptory te są obecne w różnych tkankach zarodka i organizmów dorosłych. Dużą ekspresję DD1 stwierdzono w komórkach nabłonkowych nerek i płuc, natomiast DD2 w komórkach tkanki łącznej, fibroblastach różnego pochodzenia i komórkach tkanki kostnej - chondrocytach i osteoblastach. Mechanizm wiązania receptorów domeny dyskoidyny polega na powolnej (trwającej nawet kilka godzin) i trwałej aktywacji tychże receptorów przez autofosforylację ich reszt tyrozynowych. Ma to związek z kontrolą aktywności specyficznej rodziny proteaz zależnych od cynku - MMP, które degradują składniki zewnętrznej macierzy komórkowej, uruchamiając tym samym proces przebudowy tkanek, co uważa się za kluczowe zjawisko ułatwiające komórkom migrację i inwazję, co może być szczególnie ważne w przypadku rozwoju miażdżycy, procesu kancerogenezy, czy choroby zwyrodnieniowej stawów.

Obydwa receptory domeny dyskoidyny odgrywają ważną rolę w procesie rozwoju. DD1 bierze udział w procesie tworzenia się i rozwoju narządów u zarodka, a DD2 w procesie wzrostu kości (Leitinger, 2014).

Leukocytarne receptory kompleksowe (LRC) są dużą rodziną receptorów immunoglobulinopodobnych. Ich mechanizm działania polega na wielokierunkowej regulacji

odpowiedzi immunologicznej organizmu m.in modulowaniu funkcji komórek *Natural Killer* (NK). Receptory te charakteryzują się wysoką zmiennością gatunkową. Wyróżnia je występowanie par receptorów antypatycznych, co polega na tym, iż wiązanie tego samego liganda przez receptor, generuje przeciwną odpowiedź na sygnalizację (Boraschi-Diaz i in. 2017). Przykładem receptora należącego do tej rodziny jest receptor OSCAR - zbudowany z 2 domen immunoglobulinopodobnych. Głównym miejscem wiązania kolagenu jest domena C-końcowa. Oprócz wpływu tego receptora na proces aktywacji monocytów prozapalnych i dojrzewania komórek dendrytycznych, bierze on udział w procesie różnicowania osteoklastów, gdzie na zasadzie indukcji sygnalizacji z udziałem jonów wapnia doprowadza do aktywacji czynnika jądrowego aktywowanych komórek T.

uPARAP/Endo180 - białko związane z receptorem aktywatora plazminogenu urokinazy należy do rodziny receptorów transbłonowych mannozowych glikoprotein typu I obecnych w komórkach mezenchymalnych. Jego mechanizm działania opiera się na internalizacji kolagenu - endocytozie fragmentów lub całych cząsteczek kolagenu błony podstawnej lub kolagenu śródmiąższowego, które następnie są kierowane do lizosomów, gdzie ulegają degradacji w procesie zależnym od proteaz cysteinowych. Wykazano obecność dużych ilości PARAP/Endo180 w tkance kostnej, w obszarach jej aktywnej przebudowy, zwłaszcza w obszarze kostnienia. Białko to zapoczątkowuje proces adhezji fibroblastów do kolagenu i zwiększa ich migrację do matrycy kolagenu fibrylarnego (Melander i in. 2015).

Glikoproteina VI (GPVI) należy do rodziny receptorów immunoglobulinowych. Została ona wyizolowana z płytek krwi, a liczne badania przeprowadzone z jej udziałem wskazały na znaczenie jako kolagenowego receptora płytek krwi. Kolagen oddziałując z GPVI powoduje aktywację płytek krwi, co pociąga za sobą szereg procesów fosforylacji białek m.in. kinaz Src i Syk oraz fosfolipazy PLCy2 poprzez szlak sygnałowy oparty na kinazie tyrozynowej. Prowadzi to także, do aktywacji kolejnych receptorów kolagenowych takich jak wspomniana wcześniej integryna $\alpha 2 \beta 1$ co z kolei wzmacnia sygnalizację ze strony GPVI oraz stabilizuje adhezję do kolagenu (Kralisz 2003).

5. Typy kolagenu

Rodzina kolagenowa składa się z 29 typów, które zostały ponumerowane cyframi rzymskimi (I - XXIX). Na przykład kolagen typu I składa się z dwóch łańcuchów $\alpha 1(I)$ i jednego łańcucha $\alpha 2(I)$, gdzie liczbą rzymską oznaczono typ kolagenu (Tab.1). Każdy z łańcuchów alfa kodowany jest przez oddzielną sekwencję genetyczną, która warunkuje typ kolagenu. Kolageny pod względem budowy zostały podzielone na dwie główne grupy – kolageny fibrylarnie (włókniste), do których należy kolagen typu I, II, III, V, XI, XXIV i XXVII oraz kolageny niefibrylarnie, do których należą pozostałe typy. Kolagen niefibrylarny został ponadto podzielony na kilka podgrup obejmujących kolagen błony podstawnej, kolagen kotwiczący, kolagen tworzący mikrowłókna, kolagen tworzący heksagonalne układy sieciowe, kolagen zawierający przerwana strukturą superhelisy związane z błoną komórkową transbłonowe domeny MACITs (XIII, XVII, XXIII, XXV), kolagen zasocjowany z fibryłą towarzyszącą włóknom o przerywanej strukturze helisowej FACITs (IX, XII, XIV, XVI, XVI, XIX, XX, XXI, XXII, XXVI) oraz kolagen struktury z wielokrotnie przerwana strukturą superhelisy typu MULTIPLEXINs (XV, XVIII) (Czubak i Żbikowska 2014; Morąg i Burza 2017; Wu i in 2022).

Tab. 1. Typy kolagenu, budowa i występowanie.

Typ kolagenu	Budowa	Występowanie w organizmie
Typ I	$[\alpha 1(I)]_2[\alpha 2(I)]$	Skóra, kości, ścięgna, więzadła, zębina, kościach, stawach, wątrobie, nerkach, sercu, oczach.
Typ II	$[\alpha 1(II)]_3$	Tkanka chrzęstna szklista na powierzchni stawów.
Typ III	$[\alpha 1(III)]_3$	Skóra, ścięgna, więzadła, okostna, naczynia krwionośne, tkanka łączna właściwa siateczkowata (blizny), jelita, macica, żołądek, pęcherzyk żółciowy, łożysko, pęcherz moczowy, endometrium, tkanka tłuszczowa, serce, gruczoł krokowy, śledziona, jądra, tkanki nowotworowe.

IV Seminarium Ogólnoakademickie

Typ kolagenu	Budowa	Występowanie w organizmie
Typ IV	[$\alpha 1(\text{IV})$] ₂ [$\alpha 2(\text{IV})$] ₁	Błona podstawna, membrany między komórkami.
Typ V	[$\alpha 1(\text{V})$] ₂ [$\alpha 2(\text{V})$] ₁ , [$\alpha 1(\text{V})$] ₃	Skóra, kości, tkanka chrzęstna, rogówka, łożysko, blizny
Typ VI	[$\alpha 1(\text{VI})\alpha 2(\text{VI})\alpha 3(\text{VI})$] [$\alpha 1(\text{VI})\alpha 2(\text{VI})\alpha 4(\text{VI})$]	Skóra, kości, tkanka chrzęstna, rogówka, układ nerwowy (m.in. reguluje różnicowanie się komórek Schwanna, zachowuje mielinizację i budowę nerwów obwodowych).
Typ VII	[$\alpha 1(\text{VII})$] ₃	Skóra, pęcherz moczowy, owodnia, pępowina.
Typ VIII	[$\alpha 1(\text{VIII})$] ₃ , [$\alpha 2(\text{VIII})$] ₃ , [$\alpha 1(\text{VIII})$] ₂ $\alpha 2(\text{VIII})$	Skóra, mózg, śródbłonek naczyń krwionośnych, nerki, mięsień sercowy (różnicowanie).
Typ IX	[$\alpha 1(\text{IX})$] ₁ , [$\alpha 2(\text{IX})$] ₁ , [$\alpha 3(\text{IX})$] ₁	Tkanka chrzęstna szklista, rogówka.
Typ X	[$\alpha 1(\text{X})$] ₃	Tkanka chrzęstna, kalus złamania.
Typ XI	$\alpha 1(\text{XI})\alpha 2(\text{XI})\alpha 3(\text{XI})$, $\alpha 1(\text{XI})\alpha 1(\text{V})\alpha 3(\text{XI})$	Tkanka chrzęstna, krążki międzykręgowe, kości.
Typ XII	[$\alpha 1(\text{XII})$] ₃	Skóra, ścięgna, więzadła, tkanka łączna.
Typ XIII	[$\alpha 1(\text{XIII})$] ₃	Śródbłonek naczyń krwionośnych, serce, skóra (tkanki- uczestniczy w tworzeniu ich).
Typ XIV	[$\alpha 1(\text{XIV})$] ₃	Skóra, kości, tkanka chrzęstna, występuje w włóknistej wątrobie
Typ XV	[$\alpha 1(\text{XV})$] ₃	Naczynia włosowate, jądra, nerki, serce, tkanka tłuszczowa
Typ XVI	[$\alpha 1(\text{XVI})$] ₃	Skóra, nerki, jelito (wytwarzany przez miofibroblasty)
Typ XVII	[$\alpha 1(\text{XVII})$] ₃	Hemidesmosomy, neurony kory mózgowej, hipokamp, ciało migdałowe (pośredniczy w migracji neuronów podczas morfogenezy)
Typ XVIII	[$\alpha 1(\text{XVIII})$] ₃	Błona podstawna, wątroba
Typ XIX	[$\alpha 1(\text{XIX})$] ₃	Błona podstawna, komórki mięśni gładkich przetyku
Typ XX	[$\alpha 1(\text{XX})$] ₃	Rogówka, ścięgna, skóra, chrząstka mostka
Typ XXI	[$\alpha 1(\text{XXI})$] ₃	Żołądek, nerki, ściany naczyń krwionośnych (składnik macierzy zewnątrzkomórkowej)
Typ XXII	[$\alpha 1(\text{XXII})$] ₃	Połączenia międzykomórkowe, serce, mięśnie szkieletowe
Typ XXIII	[$\alpha 1(\text{XXIII})$] ₃	Serce, siatkówka, mózg – postać złuszczone, płuca- pełna forma długości
Typ XXIV	[$\alpha 1(\text{XXIV})$] ₃	Kości, rogówka
Typ XXV	[$\alpha 1(\text{XXV})$] ₃	Mózg, serce, jądra
Typ XXVI	[$\alpha 1(\text{XXVI})$] ₃	Jądra, jajniki
Typ XXVII	[$\alpha 1(\text{XXVII})$] ₃	Tkanka chrzęstna

Typ kolagenu	Budowa	Występowanie w organizmie
Typ XXVIII	$[\alpha 1(\text{XXVIII})]_3$	Skóra, nerw kulszowy, otacza niemielizujące komórki glejowe poza końcowymi komórkami Schwanna typu II
Typ XXIX		Kolagen epidermalny

W zależności od różnych kombinacji łańcuchów alfa można uzyskać różne typy kolagenu osadzone w macierzy zewnątrzkomórkowej, gdzie każdy z nich tworzy supramolekularne agregaty.

Pełnienie różnorodnych funkcji w organizmie przez kolageny zapewnia im ich budowa, odpowiednia struktura, czyli typ i jej stabilność. Najlepiej poznanym wśród białek kolagenowych jest kolagen typu I. Ten typ odpowiada głównie za wytrzymałość tkanek na rozciąganie (elastyczność) oraz za sztywność kości. Uważa się, że jest głównym składnikiem tkanek łącznych. Ma strukturę potrójnej superhelisy, która jest zbudowana z dwóch identycznych łańcuchów alfa1(I) i jednego alfa2(I), tworząc heterotrimer. Spotkać również można drugą formę strukturalną tego białka - homotrimeryczną, będącą rzadziej występującą izoformą, która składa się z trzech łańcuchów alfa1(I). Występuje ona wyłącznie w tkankach płodowych, zwłókniałych lub nowotworowych (Chang i in. 2012; Czubak i Żbikowska 2014; Naomi i in.2021).

Kolageny odgrywają znaczącą funkcję strukturalną, będąc składnikiem tkanki łącznej, która jest niezbędna w budowie i utrzymaniu struktury skóry, narządów wewnętrznych, stawów czy układu immunologicznego ograniczając wnikanie drobnoustrojów chorobotwórczych do wnętrza organizmu (Ricard-Blum 2011).

6. Degradacja i nieprawidłowości kolagenu

Szlak degradacji kolagenu jest istotnym procesem, który odgrywa ważną rolę w usuwaniu uszkodzonego lub nadmiernie starzejącego się kolagenu z tkanek. Degradacja kolagenu obejmuje szlak, w który zaangażowane są metaloproteiny (MMP). W skład MMP wchodzi różne rodzaje enzymów, takie jak kolagenazy, żelatynazy, stromeliny, matrylizyny oraz błonowe metaloproteiny. Przynależność do tej grupy jest wynikiem kilku czynników, z których najważniejszym jest obecność atomu cynku w strukturze tych enzymów oraz zdolność do degradacji elementów macierzy zewnątrzkomórkowej (Czubak i Żbikowska 2014; Lipka i Boratyński 2008).

Nieprawidłowa budowa kolagenu spowodowana jest mutacjami oraz nieprawidłowościami podczas potranslacyjnej obróbki tego białka, m.in. na skutek braku niezbędnych kofaktorów, co prowadzi do jego błędnego fałdowania. Konsekwencją tych procesów jest rozwój chorób związanych z brakiem odpowiedniej wytrzymałości kolagenu lub powstałych w wyniku mutacji genów kodujących odpowiednie typy kolagenu, tzw. kolagenopatii. Wśród nich znajdują się skorbut (wynik niedoboru witaminy C, ponieważ pełni ona funkcję kofaktora hydroksylazy prolinowej i lizynowej podczas biosyntezy kolagenu), zespół Ehlersa-Danlosa (EDS) - defekty w syntezie, strukturze i funkcji kolagenu, wrodzona łamliwość kości - mutacje w genach *COL1A1* i *COL1A2*, zespół Alporta - mutacje w genach *COL4A3*, *COL4A4* lub *COL4A5* (Bateman i in. 2022).

7. Zastosowanie kolagenu

Kolagen stosowany jest w wielu dziedzinach medycyny. W inżynierii tkankowej znalazł zastosowanie w procesie gojenia się ran w celu przywrócenia integralności łożyska rany, dlatego może być stosowany jako środek uzupełniający w przyspieszaniu procesu gojenia. Wybitną zaletą włączenia kolagenu do opatrunków na rany jest jego zdolność do usprawnienia procesu gojenia się ran krytycznych. Istnieją różne systemy dostarczania wytwarzanych przez kolagen materiałów na rany, takie jak: nanowłókna, nici, nanocząsteczki, hydrożele, folie i gąbki (Sklenarova i in. 2022; Gajbhiye i Wairkar 2022). Kolagen jest suplementowany w wielu schorzeniach w postaci iniekcji, płynów, kapsulek i rozpuszczalnych w wodzie tabletek, najczęściej z dodatkiem witamin typu C zwiększającej jego wytwarzanie oraz E przeciwdziałającej jego sztywnieniu (Czubak i Żbikowska 2014). Preparaty kolagenowe są powszechnie stosowane dla celów kosmetycznych lub estetycznych

oraz medycznych w postaci wypełniaczy tkankowych, kremów, żeli, mikrosfer i maseczek oraz wspierających różne terapie w postaci nutriceutyków i wielu innych preparatów (Żelaszczyk i in. 2012). Kolagen wykorzystuje się również do produkcji ekologicznych opakowań (Tian i in. 2022).

8. Podsumowanie

Kolagen jest bardzo ważnym białkiem ludzkiego organizmu i odgrywa rolę m.in. w bliznowaceniu ran, pomaga zapewnić odpowiednie środowisko dla reakcji biochemicznych, a także gwarantuje integralność wielu struktur naszego organizmu. Powyższe argumenty bezsprzecznie pokazują, że kolagen to biomolekuła o wyjątkowej budowie i właściwościach, co sprawia, że stanowi on bardzo ważny element budulcowy całego organizmu, umożliwiając mu prawidłowe funkcjonowanie.

9. Literatura

- Bateman JF, Shoulders MD, Lamandé SR (2022) Collagen misfolding mutations: the contribution of the unfolded protein response to the molecular pathology. *Connection in Tissue Research* 63(3): 210-227.
- Boraschi-Diaz I, Wang J, Mort JS, Komarova SV (2017) Collagen type I as a ligand for receptor-mediated signaling. *Frontiers in Physics* 5: 12.
- Chang SW, Shefelbine SJ, Buehler MJ (2012) Structural and mechanical differences between collagen homo- and heterotrimers: relevance for the molecular origin of brittle bone disease. *Biophysical Journal* 102(3): 640–648.
- Czubak KA, Żbikowska HM (2014) Struktura, funkcja i znaczenie biomedyczne kolagenów. *Annales Academiae Medicinae Silesiensis* 68(4): 245-254.
- Ferreira AM, Gentile P, Chiono V, et al. (2012) Collagen for bone tissue regeneration. *Acta Biomaterialia* 8(9): 3191-200.
- Gajbhiye S, Wairkar S (2022) Collagen fabricated delivery systems for wound healing: a new roadmap. *Biomaterials Advances* 142: 213152.
- Gordon MK, Hahn RA (2010) Collagens. *Cell Tissue Research* 339(1): 247-257.
- Hulmes DJ (2002) Building collagen molecules, fibrils, and suprafibrillar structures. *Journal of Structural Biology* 137(1-2): 2-10.
- Kralisz Urszula (2003) Glikoproteina VI—receptor kolagenu aktywujący płytki krwi. *Postępy Biochemii* 49(1): 26-38.
- Kuivaniemi H, Tromp G (2019) Type III collagen (COL3A1): Gene and protein structure, tissue distribution, and associated diseases. *Gene* 707: 151-171.
- Leitinger B (2014) Discoidin domain receptor functions in physiological and pathological conditions. *International Review of Cell and Molecular Biology* 310: 39-87.
- Lipka D, Boratyński J (2008) Metaloproteinazy MMP. Struktura i funkcja. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 62: 328-336.
- Melander MC, Jürgensen HJ, Madsen DH, et al. (2015) The collagen receptor uPARAP/Endo180 in tissue degradation and cancer. *International Journal of Oncology* 47(4): 1177-1188.
- Naomi R, Ridzuan PM, Bahari H (2021) Current Insights into Collagen Type I. *Polymers (Basel)* 13(16): 2642.
- Ricard-Blum S (2011) The collagen family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3(1): a004978.
- Sklenarova R, Akla N, Latorre M J, et al. (2022) Collagen as a biomaterial for skin and corneal wound healing. *Journal of Functional Biomaterial* 13(4): 249.
- Tang P, Zheng T, Yang C, et al. (2022) Enhanced physicochemical and functional properties of collagen films cross-linked with laccase oxidized phenolic acids for active edible food packaging. *Food Chemistry* 393: 133353.
- Tian X, Zhao K, Teng A, et al. (2022) A rethinking of collagen as tough biomaterials in meat packaging: assembly from native to synthetic. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 23: 1-21.

Metody fizykochemiczne w badaniach naukowych

Wu M, Cronin K, Crane JS (2022) Biochemistry, collagen synthesis.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507709/>, StatPearls.

Żelaszczyk D, Waszkielewicz A, Marona H (2012) Kolagen - struktura oraz zastosowanie w kosmetologii i medycynie estetycznej. *Estetologia Medyczna i Kosmetologia* 2(1): 14-20