

Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce

Nauki przyrodnicze

Część I



www.mlodzinaukowcy.com

Poznań 2020

Redakcja naukowa

dr Jędrzej Nyćkowiak

dr hab. Jacek Leśny, prof. UPWR

Wydawca

Młodzi Naukowcy

www.mlodzinaukowcy.com

wydawnictwo@mlodzinaukowcy.com

ISBN (całość 978-83-66392-51-9)

ISBN (wydanie online 978-83-66392-85-4)

ISBN (wydanie drukowane 978-83-66392-86-1)

Ilość znaków w książce: 422 tys.

Ilość arkuszy wydawniczych: 10.6

Data wydania: czerwiec 2020

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

Spis treści

1. Mechanizmy adsorpcji białek na powierzchni ciała stałego w kontekście ich stabilności wewnętrznej oraz zdolności agregacyjnych	7
<i>Fijałkowska Gracja, Medykowska Magdalena, Wiśniewska Małgorzata</i>	
2. Agregacja minerałów ilastych w obecności poliakryloamidu i jonów metali ciężkich	13
<i>Fijałkowska Gracja, Szewczuk-Karpisz Katarzyna, Wiśniewska Małgorzata</i>	
3. Wyznaczanie wydajności procesu utleniania wody morskiej do wolnego chloru na fotoanodach z mezoporowatego tlenku wolframu(VI)	21
<i>Jadwiszczak Michał</i>	
4. Molekularne mechanizmy fototoksyczności leków	29
<i>Lejwoda Karolina, Gumieniczek Anna</i>	
5. Chropowatość powierzchni biomateriału jako jeden z czynników warunkujących odpowiedź biologiczną komórki.	35
<i>Agata Ładniak</i>	
6. BAM – nowoczesna technika badawcza substancji amfifilowych w czasie rzeczywistym	42
<i>Ładniak Agata</i>	
7. Wykorzystanie filmów biopolimerowych jako nośników kofeiny	49
<i>Katarzyna Łupina, Justyna Bochnak-Niedźwiecka</i>	
8. Właściwości prozdrowotne i możliwości wykorzystania astaksantyny	56
<i>Katarzyna Łupina</i>	
9. Usuwanie barwników z roztworów wodnych w procesie wymiany jonowej	62
<i>Polska-Adach Ewelina</i>	62
10. Sorpcja barwników kwasowych, bezpośrednich i reaktywnych z roztworów wodnych przy wykorzystaniu sorbentów różnego typu	69
<i>Polska-Adach Ewelina</i>	
11. Biokompatybilność syntetycznych materiałów polimerowych	76
<i>Kacper Przykaza</i>	
12. Modele opracowywania systemów dostarczania leków	83
<i>Kacper Przykaza</i>	
13. Biosurfaktanty bakteryjne a tworzenie biofilmu	88
<i>Rekiel Edyta</i>	
14. Biosurfaktanty w medycynie	93
<i>Rekiel Edyta</i>	
15. Triterpeny pentacykliczne o działaniu przeciwbakteryjnym. Część I - kwas azjatykowy.	98
<i>Zuzanna Sycz, Monika Sępek</i>	
16. Triterpeny pentacykliczne o działaniu przeciwbakteryjnym. Część II - kwas ursolowy.	105
<i>Zuzanna Sycz, Monika Sępek</i>	
17. Antyutleniacze, ich rola w życiu człowieka	113
<i>Klaudia Woźniak</i>	

Przedmowa

Szanowni Państwo, wydawnictwo „Młodzi Naukowcy” oddaje do rąk czytelnika pięć monografii, o których w sposób ogólny można powiedzieć, że dotyczą nauk przyrodniczych. Dwie z nich poświęcone są żywieniu, żywności i medycynie, kolejne dotyczą flory i fauny oraz hodowli zwierząt.

W pierwszej z prezentowanych monografiach kilka rozdziałów porusza zagadnienia związane z wpływem żywienia na zdrowie, czyli generalnie prezentowany jest pogląd że dobra dieta to bardzo ważny element naszego życia. Niestety nasze nawyki żywieniowe są bardzo dalekie od ideału, zarówno co do składu, jak i kaloryczności pożywienia. W jednym z rozdziałów poruszono problemy rosnącej liczby osób ze zbyt dużą masą ciała, co w długiej perspektywie może się odbijać na zdrowiu, a na co dzień zmniejsza komfort życia. Podstawową metodą radzenia sobie z otyłością i nadwagą jest odpowiednia dieta o ujemnym bilansie kalorycznym oraz dodatkowo zwiększenie aktywności fizycznej.

W następnej z monografii nadal analizowano wpływ diety na zdrowie i kondycję fizyczną. Dwa rozdziały poświęcono diecie osób uprawiających sporty siłowe. Jej właściwy dobór jest niezwykle istotne dla sportowców, szczególnie tych uprawiających sport wyczynowy, gdzie uzyskiwanie wysokich wyników sportowych ma kluczowe znaczenie. Cieszy że takimi zagadnieniami zajmują się też doktoranci. Dwa rozdziały poświęcono też herbacie, która w Polsce jest jednym z podstawowych napojów, a posiada też właściwości lecznicze i antyoksydacyjne. Oczywiście mowa tu o różnych rodzajach herbat.

Trzecia z monografii dotyczy flory i fauny, pierwsze rozdziały traktują o kulturach in vitro różnych roślin. Analizowane są w nich wpływy nanocząsteczek srebra i kwasu askorbinowego na wzrost roślin i łagodzenie stresu wywołanego związkami ołowiu. Jeden z rozdziałów dotyczy dość szczególnego wykorzystania oleju roślinnego, jako środka smarnego. Olej roślinny niezależnie od rośliny z jakiej pochodzi należy do surowców biodegradowalnych i szczególnie może być przydatny w sytuacji gdy nie jest możliwe jego zebranie i utylizacja, a pozostaje on w środowisku. Taka sytuacja zachodzi podczas smarowania pilarek łańcuchowych, nie da się wówczas uniknąć pozostawiania jego cząsteczek w środowisku.

W czwartej monografii mamy rozdziały dotyczące badań procesów zachodzących w środowisku, procesów biologicznych i chemicznych. Rozważane są tu m.in zjawiska agregacji minerałów w obecności wybranych jonów, możliwości usuwania barwników z wody, modelowanie procesów dostarczania leków i wiele innych.

Ostatnia monografia w tej serii dotyczy w większości hodowli zwierząt, w szczególności drobiu. Jest to w tej chwili bardzo duża gałąź produkcji rolniczej w Polsce i to zarówno w zakresie produkcji jaj konsumpcyjnych, jak i mięsa. W kolejnych rozdziałach rozważane są zagadnienia związane z przechowywaniem jaj, ich znaczenia w diecie ludzi, żywienia drobiu oraz jego chorób. Jak można wnioskować duże znaczenie ekonomiczne hodowli drobiu przekłada się na szerokie zainteresowanie naukowców problemami jakie pojawiają się w trakcie tej produkcji. Kilka kolejnych rozdziałów dotyczy zdrowia i żywienia zwierząt domowych: psów i kotów. Zwierzęta te towarzyszą nam od dawna ale jeszcze kilkanaście lat temu były traktowane raczej przedmiotowo, obecnie awansowały na członków rodziny co przekłada się na rozwój gabinetów weterynaryjnych, kosmetycznych oraz produkcję specjalnej żywności. Jednocześnie też jak widać po publikowanych pracach skutkuje zainteresowaniem naukowców.

Polecam zestaw pięciu interesujących monografii i życzę wielu refleksji związanych z tematyką zaprezentowanych prac badawczych.

dr hab. Jacek Leśny
prof. UPWR

1. Mechanizmy adsorpcji białek na powierzchni ciała stałego w kontekście ich stabilności wewnętrznej oraz zdolności agregacyjnych

Mechanisms of protein adsorption on the solid surface with regard to their internal stability and aggregation abilities

Fijałkowska Gracja, Medykowska Magdalena, Wiśniewska Małgorzata

Katedra Radiochemii i Chemii Środowiskowej, Instytut Nauk Chemicznych, Wydział Chemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Pl. Marii Curie-Skłodowskiej 3, 20-031 Lublin
Opiekun naukowy: dr hab. Małgorzata Wiśniewska, prof. nadzw.

Fijałkowska Gracja: gracja.fijalkowska@poczta.umcs.lublin.pl

Słowa kluczowe: biopolimery, stabilność białek, adsorpcja, konformacja makrocząsteczek, agregacja

Streszczenie

Charakterystyczna złożona budowa makrocząsteczek białek oraz ich szerokie i powszechne występowanie powoduje, że adsorpcja biopolimerów na powierzchniach różnych ciał stałych jest ważnym zagadnieniem naukowym. Białka to związki polimeryczne, których struktury stabilizowane są przez szereg oddziaływań, nadających im specyficzne właściwości. Omawianym procesem kierują czynniki, takie jak: pH, siła jonowa, temperatura oraz rodzaj elektrolitu podstawowego. Ponadto bardzo istotne są czynniki wewnętrzne, do których należą: rozmiar i kształt cząsteczki białka, jego stabilność strukturalna, a także polarność samego adsorbentu. Kształt cząsteczek protein wymusza specyficzną orientację molekuł na powierzchni ciała stałego, co może skutkować „wzmocnieniem” lub „osłabieniem” ich specyficznych właściwości. Zmiany konformacyjne białka mogą prowadzić do nabywania nowych cech uprzednio niewystępujących. W literaturze fachowej znaleźć można wiele koncepcji opisujących zjawisko adsorpcji w tego typu układach. Jedną z nich zakłada występowanie energii swobodnej (złożonej z wkładów entropowego i entalpowego) jako siły napędowej procesu. Kolejnymi teoriami są: teoria DLVO, teoria adsorpcji Langmuira, teoria RSA oraz efekt Vromana.

1. Wstęp

Adsorpcja białek jest tematem bardzo istotnym z punktu widzenia wielu dyscyplin naukowych, począwszy od medycyny, poprzez farmakologię, a skończywszy na biotechnologii czy biofizyce. Jest to zjawisko bardzo częste i może mieć zarówno korzystne, jak i niekorzystne skutki. Do niekorzystnych efektów można zaliczyć chociażby destrukcyjny wpływ białek na implanty medyczne oraz sztuczne organy, czy zmniejszenie czułości biosensorów. Z kolei korzystne aspekty tego zjawiska to między innymi zastosowanie w analizie chemicznej i zapobieganie niepożądanym zjawiskom np. wytrącania osadów w napojach alkoholowych takich jak wino i piwo.

Budowa białek jest specyficzna, przez co sam proces ich adsorpcji staje się bardzo złożony. Istotnym zatem wydaje się być zrozumienie jego przebiegu, a w tym zagadnień takich jak: czynniki ułatwiające i ograniczające zachodzenie adsorpcji, konformacja białka oraz jego orientacja na powierzchni adsorbującej. W literaturze przedmiotu istnieje wiele teorii opisujących rządzące tym procesem mechanizmy, a także możliwe jego następstwa.

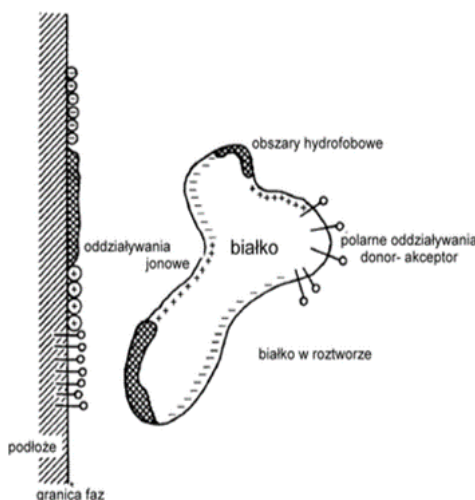
2. Opis zagadnienia i przegląd literatury

Biopolimery to szeroka grupa związków wielkocząsteczkowych pochodzenia naturalnego, czyli produkowanych przez organizmy żywe. Są syntetyzowane in vivo w komórkach i odznaczają się stereoregularną strukturą. Ich podstawowy podział opiera się na czterech grupach, tj.: białka, kwasy nukleinowe, kauczuki naturalne oraz polisacharydy (Rabek 2017). Białka zaliczają się do polipeptydów, czyli związków zbudowanych z α -aminokwasów o stopniu polimeryzacji powyżej 100 (co odnosi się do średniej ilości merów, z jakich składa się pojedyncza makrocząsteczka danego polimeru). Białka występujące w przyrodzie są zbudowane z 20 podstawowych aminokwasów połączonych wiązaniem peptydowym, które powstaje między grupą amidową jednego meru i grupą

α -aminową kolejnego. Ta podstawowa sekwencja nazywana jest strukturą pierwszorzędową. Struktura drugorzędowa opisuje konformacje fragmentów łańcucha białka, z kolei struktury trzecio- i czwartorzędowe określają przestrzenne położenie łańcuchów oraz ich wzajemną organizację. Białka stabilizowane są przez wiązania niekowalencyjne (m.in. oddziaływania hydrofobowe i elektrostatyczne, a także wiązania wodorowe) oraz kowalencyjne (m.in. wiązania peptydowe i dwusiarczkowe). Otrzymywane na skalę przemysłową biopolimery syntetyczne to z kolei związki syntetyzowane *in vitro*, przez co ich struktura nie może być ściśle kontrolowana (Turner i in. 2011).

Proces adsorpcji białek uzależniony jest od czynników środowiska zewnętrznego, takich jak: pH, temperatura, rodzaj elektrolitu podstawowego oraz siła jonowa. Pierwszy z czynników, temperatura, ma wpływ na równowagę termodynamiczną, a także na kinetykę adsorpcji. Wysoka temperatura powoduje zwiększoną dyfuzję cząsteczek białek, a co za tym idzie, wydajność procesu rośnie wraz ze wzrostem wielkości tego parametru, aż do osiągnięcia temperatury powodującej denaturację białka. Z kolei pH będzie miało wpływ na występowanie w układzie oddziaływań elektrostatycznych, a także na ich siłę. Jest to o tyle istotne, że w zależności od pH cząsteczki białek mogą cechować się różnym ładunkiem. W niskim zakresie pH (niższym od wartości punktu izoelektrycznego) białka z reguły są naładowane dodatnio, natomiast w zakresie pH przewyższającym punkt izoelektryczny biopolimeru (pI) będą cechować się ładunkiem ujemnym. Ponadto, w przypadku gdy powierzchnia adsorbentu jest naładowana, proces adsorpcji jest ściśle związany z siłami elektrostatycznymi (Hames i Hooper 2010).

Na omawiane zjawisko wpływają także czynniki wewnętrzne. Ze względu na różną budowę, stabilność oraz rozmiar cząsteczek, białka oddziałują w sposób różnorodny z powierzchnią ciała stałego. Przykładowo, sztywne i małe cząsteczki „niechętnie” zmieniają swoją konformację, natomiast średnie molekuly dzięki zachodzącym zmianom konformacyjnym nabywają odmiennych właściwości. Bezpośrednim skutkiem takich zmian jest uwydatnienie wybranej części struktury makrocząsteczki. Rozmiar białka ma dodatkowo wpływ na transport ich cząsteczek - te o mniejszych rozmiarach dyfundują z większą łatwością niż te duże. Co więcej, te ostatnie mogą powodować „wypychanie” mniejszych molekuł z warstwy adsorpcyjnej. Warto również zaznaczyć, że białka „chętniej” oddziałują z powierzchniami polarnymi, cechującymi się wysokim napięciem powierzchniowym. Sorbenty obojętne elektrycznie nie są tak skuteczne w wiązaniu adsorbentu. Najważniejszą cechą determinującą wydajność adsorpcji jest zatem hydrofobowość podłoża. Białka mogą posiadać obszary charakteryzujące się różnymi właściwościami, a co za tym idzie w różny sposób oddziaływać z powierzchnią (Rys. 1).



Rys. 1. Schematyczne przedstawienie oddziaływań pomiędzy białkiem a powierzchnią adsorbentu (Zemła 2012)

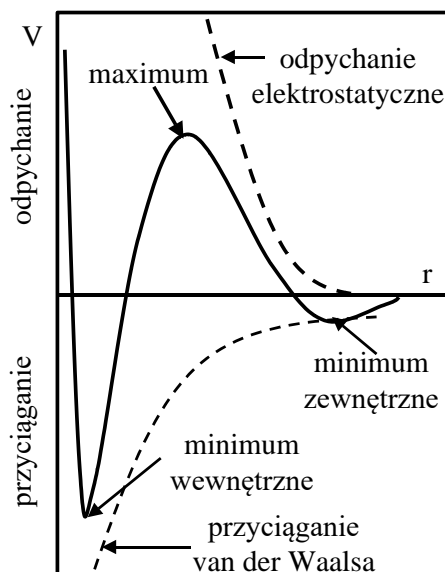
Z powodu asymetrycznej budowy, białka w różny sposób orientują się na powierzchni ciała stałego. Najczęściej występującymi kształtami są elipsy, chociaż zdarzają się także białka o kształtach sferycznych, Y- czy serco-podobnych. Taka budowa wymusza przybieranie określonej orientacji, będącej wynikiem tego, która z części białka i o jakich właściwościach zostanie związana, a która będzie wyeksponowana do roztworu. Teoretyczne założenia sugerują, że białka adsorbując się przykładowo na powierzchni obdarzonej ładunkiem, będą „eksponować” w stronę ciała stałego fragmenty o przeciwnym znaku. Występujące jednak oddziaływania boczne pomiędzy sąsiednimi cząsteczkami białka mogą zaburzać te prawidłowości, powodując zarówno zwiększenie, jak i zmniejszenie agregacji molekuł. Dodatkowym aspektem, który należy wziąć pod uwagę, są zmiany konformacyjne dokonujące się podczas samego procesu adsorpcji.

Proces wiązania białek na granicy faz ciała stałe-roztwór nie jest zależny tylko od właściwości adsorbujących się cząsteczek i samego sorbentu. Niemalże znaczenie dla jego przebiegu ma również rozpuszczalnik. W przypadku białek rozpuszczalnikiem tym jest najczęściej woda, która wiąże się zarówno z białkami, jak i z sorbentem. Biorąc pod uwagę ten czynnik, proces adsorpcji obejmuje także oddziaływania pomiędzy cząsteczkami wody i białkiem, a także między cząsteczkami wody i grupami powierzchniowymi adsorbentu. Dodatkowo występuje zjawisko zastępowania związanych molekuł wody molekułami białek, co ma wpływ na zmiany entropii w układzie (Zemła 2012).

Teoretyczne koncepcje dotyczące adsorpcji białek są cały czas przedmiotem badań i żadna z opisanych poniżej teorii nie może być traktowana jako wystarczająca do pełnej charakterystyki tego procesu. Ponadto, istnieje szereg czynników wpływających na ten złożony mechanizm, więc aby go przybliżyć, należy posłużyć się pewnymi założeniami. Jedną z takich koncepcji zakłada, że białka adsorbują się na powierzchniach w sposób bardzo łatwy, co związane jest z sumą czynników tworzących siłę napędową takiego procesu. Termin „siła napędowa” odnosi się do wkładów entropii i entalpii do wzrostu całkowitej energii swobodnej podczas adsorpcji białka. Wkład związany z entalpią to oddziaływania takie jak: kulombowskie, elektrostatyczne, czy van der Waalsa. Dodatkowo wpływ mają istniejące oddziaływania hydrofobowe o sporym zasięgu i dużej sile, a także wiązania wodorowe. Zarówno w przypadku sił hydrofobowych, jak i wiązań wodorowych kwestia przynależności do danego wkładu jest sporna. Uznaje się również, że wnoszą one wkład do entropii, gdyż tworzenie się wiązań wodorowych pomiędzy powierzchnią, na której zachodzi adsorpcja a białkiem, w początkowym etapie wymaga „zniszczenia” wiązań już istniejących. Co za tym idzie, następuje wzrost nieuporządkowania w układzie, a tym samym wzrost samej entropii. Wzrost entropii będzie także zachodził na skutek zmiany struktury białka, a także z powodu desorpcji wody i jonów soli z powierzchni. Wkład entropowy zależny jest dodatkowo od strukturalnej trwałości białka i powinowactwa do cząsteczek rozpuszczalnika.

Białka mają złożoną budowę, dzięki czemu w zależności od natury powierzchni, na której ulegają adsorpcji orientują się w inny sposób. Na powierzchniach hydrofobowych kontakt jest zapewniony poprzez niepolarną część proteiny. Analogicznie w przypadku powierzchni hydrofilowych czy elektrycznie nieobojętnych białko będzie zorientowane stroną polarną lub naładowaną. W takich przypadkach wiązanie białka na danej powierzchni jest spowodowane głównie oddziaływaniami van der Waalsa lub elektrostatycznymi. Siły elektrostatyczne zależne są głównie od stężenia rozpuszczonych jonów oraz pH roztworu i wydają się być niezwykle istotne dla zrozumienia mechanizmu adsorpcji na powierzchniach naładowanych. W tym przypadku całkowita energia pochodzi od oddziaływań ładunków ulokowanych wewnątrz cząsteczki białka z molekułami biopolimeru, które znajdują się w pobliżu, a także z naładowaną powierzchnią. Istnieje teoria opisująca przypadek niezależnego występowania oddziaływań van der Waalsa oraz sił podwójnej warstwy elektrycznej, czyli oddziaływań elektrostatycznych występujących w pobliżu naładowanej powierzchni (Rys.2). W takim przypadku zmiany siły jonowej układu mają wpływ na grubość podwójnej warstwy elektrycznej utworzonej na powierzchni cząstki ciała stałego, przy czym nie mają wpływu na siły van der Waalsa. Gdy siła jonowa osiąga duże wartości, to pomimo wysokiej bariery energetycznej, układy są metastabilne. Jest to jeden ze sposobów elektrostatycznego stabilizowania suspensji. Teoria ta nosi nazwę DLVO i została początkowo opracowana dla układów koloidalnych niezawierających substancji polimerowej. Aktualnie jednak wykorzystuje się ją także do opisu zmian

oddziaływań elektrostatycznych zachodzących podczas zmian pH w układach z zaadsorbowanym białkiem (Aidara i in. 2001).



Rys. 2. Schematyczny profil energii oddziaływania dwóch cząstek w funkcji ich odległości według teorii DLVO (Aidara i in. 2001)

Inną teorią, na której bazują koncepcje dotyczące adsorpcji protein jest izoterma adsorpcji Langmuira. Jednak znacznie lepiej sprawdza się ona do opisu adsorpcji molekuł gazu, które charakteryzują się małym rozmiarem, dużą symetrią oraz wysoką stabilnością. W przypadku białek, jak już wspomniano wcześniej, proces ten jest bardziej złożony. Przede wszystkim białka charakteryzują się bardzo szerokim spektrum kształtów, rozmiarów oraz właściwości. Dodatkowo struktury drugorzędowe i trzeciorzędowe narzucają swoiste rozmieszczenie dla dodatnio i ujemnie naładowanych łańcuchów bocznych, a także determinują ich powinowactwo do wody. W zależności od tych uwarunkowań różny wpływ na adsorpcję będzie miało pH, siła jonowa, czy temperatura.

Białka mogą być klasyfikowane jako „miękkie” oraz „twarde” w zależności od tego jak łatwo zmieniają swoją strukturę. Odnosi się to między innymi do przypadków, gdy podczas zachodzenia adsorpcji nie jest preferowana natywna struktura białka, a także gdy sam proces wymusza zmiany konformacji i orientacji cząsteczek proteiny. Siłą napędową tego zjawiska jest przede wszystkim oddziaływanie pomiędzy powierzchnią a białkiem, a także wynikająca z tego utrata uporządkowania w układzie, a co za tym idzie wzrost entropii. Spłaszczenie warstwy adsorpcyjnej białka, odporność na desorpcję, czy wtórne zmiany struktury to efekty konformacyjne obserwowalne makroskopowo. Występuje także reorientacja cząsteczki białka, która skutkuje zmianą orientacji cząsteczki jako całości przy niewielkim stopniu zmian mikroskopowych. Takie zachowanie obserwowane jest w przypadku tzw. protein „twardych” (o dużej stabilności wewnętrznej). Sam proces adsorpcji może wpływać pozytywnie na trwałość protein, między innymi poprzez stabilizację ich struktury. To z kolei będzie skutkowało większą odpornością na czynniki denaturujące. Aktywność biologiczna białka może być uzyskana w procesie adsorpcji, w wyniku wyżej wspomnianych zmian strukturalnych, a także w innej sytuacji z tych samych powodów zahamowana. Dzieje się tak w przypadku niektórych enzymów lub receptorów, które po desorpcji tracą swoją pierwotną strukturę (Al-Hakeim i in. 2016).

Różny stopień oddziaływań między cząsteczkami białkami, a także specyfika ich właściwości agregacyjnych może skutkować różnymi rodzajami struktur agregacyjnych - mogą być one jednowarstwowe i wielowarstwowe. Pojedyncza warstwa tworzy się w przypadkach, gdy białka nie posiadają powinowactwa do siebie nawzajem, mają ładunek o tym samym znaku lub gdy oddziaływania między nimi są stosunkowo słabe. Analogicznie, odwrotność tej sytuacji będzie

skutkować tworzeniem się wielu warstw. Z kolei gęstość upakowania warstw agregacyjnych uzależniona jest głównie od sił elektrostatycznych występujących w rozpatrywanym układzie. Gdy punkt izoelektryczny białka nie jest równy co do wartości pH roztworu oraz gdy siła jonowa roztworu jest mała, to tworząca się warstwa będzie cechować się luźnym upakowaniem. Z kolei, gdy pH jest równe pI oraz roztwór odznacza się dużą siłą jonową, to gęstość powstałej warstwy proteinowej będzie wysoka. Zależność ta również będzie dotyczyć sytuacji, gdy proces adsorpcji jest nieodwracalny. W przypadku braku oddziaływań pomiędzy białkami wypełniają one przestrzeń adsorpcyjną preferencyjne w sposób luźny. Według teorii RSA („ciągłej losowej adsorpcji”), białka ulegają adsorpcji trafiając jedynie na wolną przestrzeń na powierzchni. Jeśli adsorbujące się białko „trafi” na cząsteczkę już związaną, to zostanie ono wypchnięte z powrotem do objętości roztworu. Skutkuje to nieefektywnym pokryciem warstwy powierzchniowej i tworzeniem się luk, których ilość rośnie wraz ze zwiększeniem się liczby zaadsorbowanych molekuł białek. Biorąc pod uwagę większą dowolność pozycji adsorbujących się makrocząsteczek białka, teoria RSA uznawana jest za bardziej realistyczną niż adsorpcja wg teorii Langmuira (Szewczuk-Karpisz 2016). Nie świadczy to jednak o całkowitej poprawności teorii RSA, gdyż dla omawianego procesu mogą mieć znacznie także inne czynniki.

Jak już zostało wspomniane powyżej, na adsorpcję mają wpływ także oddziaływania boczne naładowanych białek. Najczęściej spotykane mają charakter odpychający, gdyż białka tego samego rodzaju charakteryzują się jednoimiennymi znakami ładunku. Prowadzi to do tworzenia luźno upakowanej warstwy adsorpcyjnej. Bazując na tej zależności, proces ten może być łatwo opisany poprzez parametr charakteryzujący tzw. rozmiar efektywny białka. Nie jest to jednak do końca słuszne, gdyż równie często obserwuje się oddziaływania cząsteczek białek już zaadsorbowanych z tymi niezaadsorbowanymi, które prowadzą do przyspieszenia procesu poprzez zwiększenie dostępnej powierzchni. Zjawisko to opisywane jest przez mechanizmy agregacji powierzchniowej. Jest ono spowodowane dwoma czynnikami. Po pierwsze, białka „chętniej” adsorbują się na powierzchniach już zajętych przez związki pokrewne. Po drugie, utworzone zostaje specyficzne pole elektrostatyczne, które indukuje samoistne gromadzenie się białek, co zwiększa efektywność adsorpcji. Chociaż samo zjawisko jest często obserwowane, to nadal trwa spór odnośnie matematycznego opisu tych zależności. Z drugiej strony, może wystąpić także odpychanie się mechaniczne białek, co może skutkować desorpcją białka już związanego. Występuje to w przypadkach, gdy w mieszaninie białek molekuły o większych rozmiarach wypychają z warstwy adsorpcyjnej te o mniejszych rozmiarach. Wpływ oddziaływania pomiędzy proteinami nie ogranicza się tylko do samej sorpcji, ale także ma wpływ na zmiany orientacyjne i konformacyjne ich makrocząsteczek. Uznaje się, że następują one po przekroczeniu pewnej granicy, a mianowicie gdy średnia odległość pomiędzy cząsteczkami białka zostanie odpowiednio zmniejszona. Ponadto wysoka siła jonowa roztworu będzie skutkowała zwiększeniem stopnia agregacji układu.

Podczas procesu adsorpcji, przy ciągłym napływie protein w okolice adsorbentu, pokrycie powierzchni wzrasta, aż do momentu ustalenia się równowagi między adsorpcją a desorpcją. Ma to miejsce, gdy sorbent staje się wysycony i nie może związać większej ilości cząsteczek. W przypadku procesu nieodwracalnego sytuacja jest całkiem podobna. Istnieje jednak model czasowego opóźnienia, który dopuszcza przekroczenie możliwości „pojemnościowych” sorbentu. Dzieje się tak na skutek opóźnienia desorpcji, wynikającego z czasu potrzebnego na zmiany konformacji białka. W takim przypadku nadal występuje adsorpcja cząsteczek bez uprzedniego opuszczenia warstwy adsorpcyjnej przez cząsteczki „nadmiarowe”. W ten sposób powierzchnia sorbentu staje się przesycona. Model ten, podobnie jak poprzednie, ma jednak swoje ograniczenia i sprawdza się głównie do układów, gdzie rozważaną cząsteczką jest monomer lub polimer zawierający małą liczbę segmentów, w porównaniu do tej występującej w białkach. Udowodniono także występowanie efektu Vromana, które powoduje pojawienie się lokalnego maksimum na wykresach kinetyki adsorpcji.

Dosyć ważnym aspektem jest także tworzenie się agregatów białkowych. Prowadzi to nie tylko do znaczącego wpływu na kinetykę procesu, ale także na samą strukturę warstw adsorpcyjnych. Proces ten oznacza kumulowanie się białek. Uznaje się, że zjawisko to może być spowodowane zarówno dyfundowaniem cząsteczek białek do obszarów „bogatszych” w zaadsorbowane molekuły, jak i adsorpcją nowych protein. Jedną z unikatowych cech tych biomolekuł jest fakt, że wykazują one

spore powinowactwo do obszarów na powierzchni ciała stałego, uprzednio zajętych przez inne cząsteczki białka (Rabe 2009).

3. Podsumowanie

Adsorpcja białek jest determinowana przez szereg czynników, do których zaliczają się zarówno te zewnętrzne, czyli określające środowisko procesu, jak i te wewnętrzne, które związane są z właściwościami samego białka i adsorbentu. Uwzględniając specyficzne cechy protein, zjawisko ich adsorpcji na powierzchni ciała stałego można tłumaczyć przy zastosowaniu wielu modeli. Teorie takie jak DLVO czy RSA w znacznym stopniu przybliżają mechanizm przebiegu procesu i ułatwiają jego zrozumienie. Budowa białek wpływa również na ich rozmieszczenie w warstwie adsorpcyjnej i kinetykę jej tworzenia, a także na zmiany orientacyjne i konformacyjne samych molekuł. To z kolei bardzo często skutkuje modyfikacją właściwości samych białek, zarówno o charakterze odwracalnym, jak i nieodwracalnym.

4. Literatura

- Aidara JH, Suvacib E, Sindela J (2001) Surface and Colloid Chemistry: Encyclopedia of Materials: Science and Technology
- Al-Hakeim HK, Khudhair MK, Grulke EA (2016) Immobilization of urease enzyme on nanoceria modifies secondary and tertiary protein structures. *Acta Chimica Slovaca* 9(1): 44-53
- Hames D, Hooper N (2010) Krótkie wykłady. Biochemia. PWN. Warszawa
- Rabek JF (2017) Współczesna wiedza o polimerach. Polimery naturalne i syntetyczne, otrzymywanie i zastosowania. PWN. Warszawa
- Rabe M (2009) Understanding protein adsorption phenomena on solid surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science* 162: 87-106
- Szewczuk-Karpisz K (2016) Badanie wpływu adsorpcji biopolimerów na stabilność wodnych suspensji tlenków mineralnych. Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Wydział Chemii, rozprawa doktorska
- Turner P, McLennan A, Bates A, White M (2011) Krótkie wykłady. Biologia molekularna. PWN. Warszawa
- Zemła J (2012) Adsorpcja białek i tworzenie ich wzorów na powierzchni cienkich warstw polimerów. Uniwersytet Jagielloński, Instytut Fizyki, rozprawa doktorska

2. Agregacja minerałów ilastych w obecności poliakryloamidu i jonów metali ciężkich

Fijałkowska Gracja⁽¹⁾, Szewczuk-Karpisz Katarzyna⁽²⁾, Wiśniewska Małgorzata⁽¹⁾

⁽¹⁾Katedra Radiochemii i Chemii Środowiskowej, Wydział Chemii,
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

⁽²⁾Instytut Agrofizyki im. Bohdana Dobrzańskiego Polskiej Akademii Nauk w Lublinie
Opiekun naukowy: dr hab. Małgorzata Wiśniewska, prof. nadzw.

Fijałkowska Gracja: gracja.fijałkowska@poczta.umcs.lublin.pl

Słowa Kluczowe: agregacja, flokulacja, poliakryloamid, adsorpcja

Streszczenie

Flokulanty/kondycjonery poliakryloamidowe (PAM) są przyjaznymi dla środowiska polimerami, które wykazują zdolność do stabilizacji i polepszania struktury gleb. Oddziałując z cząstkami glebowymi przyczyniają się one do zwiększenia stopnia agregacji i spójności gleby, a tym samym zmniejszenia jej podatności na erozję wodną i wietrzną. Dodatkowo, kondycjonery dodawane do podłoża mogą wpływać na mobilność i dostępność biologiczną związków i substancji obecnych w glebie, w tym jonów metali ciężkich.

Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu jonowego poliakryloamidu oraz jonów metali ciężkich na agregację minerału ilastego należącego do grupy glinokrzemianów warstwowych – kaolinitu, powstającego w procesie wietrzenia skał osadowych. W strukturze tego minerału można wyróżnić oktaedryczne warstwy glinotlenowe oraz tetraedryczne warstwy krzemotlenowe, które łącząc się jednostronnie ze sobą za pomocą wiązań wodorowych tworzą dwuwarstwowe pakiety. Podczas prac doświadczalnych zmierzono zmiany stabilności suspensji kaolinitu bez i w obecności poliakryloamidu i jonów metali ciężkich w funkcji czasu z wykorzystaniem turbidymetru. W ten sposób określono, czy dwa rodzaje adsorbatów (tj. związek wielkocząsteczkowy i jony metalu ciężkiego) dodane do układu razem lub osobno sprzyjają tworzeniu agregatów wybranego ciała stałego. Uzyskane rezultaty zestawiono z wynikami pomiarów wielkości adsorpcji poliakryloamidu i jonów metali ciężkich na powierzchni minerału. Do badań wykorzystano poliakryloamid anionowy i kationowy. Natomiast spośród metali ciężkich wybrano jony chromu(VI) i ołowiu(II).

1. Wstęp

Poliakryloamidy (PAM) stanowią grupę syntetycznych polielektrolitów rozpuszczalnych w wodzie, które otrzymywane są z monomeru akryloamidowego w procesie polimeryzacji (Kang i in. 2013, DeBoodt 1993, Kadajji i Betageri 2011). Ze względu na zdolność do rozpuszczania, dyspergowania i pęcznienia w wodzie, mogą one modyfikować właściwości fizyczne układu wodnego w wyniku procesu zagęszczania, żelowania, emulgowania lub stabilizacji. Poliakryloamidy można podzielić na niejonowe, anionowe i kationowe (Shatat i in. 2018), a każdy z nich znajduje zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu, głównie w uzdatnianiu wody, przetwarzaniu minerałów lub w rolnictwie jako tzw. kondycjonery gleby (Craciun i in. 2015, Myagchenkov i Kurenkov 1991).

Podczas adsorpcji na powierzchni ciała stałego makrocząsteczka polimeru może przybierać różne konformacje (np. pętle, ciągi lub ogony) i w rezultacie tylko kilka jej fragmentów może mieć bezpośredni kontakt z powierzchnią. Gdy ciało stałe jest niecałkowicie pokryte łańcuchami polimerowymi i jednocześnie zakres oddziaływania elektrostatycznego między makrocząsteczkami jest mniejszy niż długość pętli i ogonów polimeru, w układzie następuje tworzenie się mostków polimerowych. Innymi słowy, zachodzi proces flokulacji sprzyjający tworzeniu się agregatów o znacznej wielkości (Adachi 2019). Flokulacja może być również wynikiem neutralizacji ładunku ciała stałego przez makrocząsteczki polielektrolitu posiadające ładunek o przeciwnym znaku. W przypadku wysokich stężeń polimeru powierzchnia ciała stałego pokrywana jest całkowicie przez warstwę polimerową, a to może z kolei powodować stabilizację steryczną układu. W takiej sytuacji pomiędzy cząstkami z zaadsorbowanym polimerem pojawia się odpychanie steryczne. W przypadku,

gdy adsorbujący się polimer jest polielektrolitem, stabilizacja steryczna może być połączona ze stabilizacją elektrostatyczną (Guezennec i in. 2015). Działanie związku makrocząsteczkowego (stabilizujące lub flokulujące) jest uzależnione od szeregu czynników takich jak: struktura, konformacja, rozpuszczalność i stopień polimeryzacji związku wielkocząsteczkowego (Al-Hashmi i Luckman 2010, Nowicki i Nowicka 2001).

Adsorpcja polimeru, np. PAM, jest często stosowana w kondycjonowaniu gleby. Flokulanty poliakryloamidowe są przyjaznymi dla środowiska polimerami, które wykazują zdolność do stabilizacji i polepszania struktury gleb. Korzystne działanie PAM związane jest głównie z właściwościami polimeru (masa cząsteczkowa, charakter jonowy) i polega na zwiększaniu stopnia agregacji oraz spójności gleby w wyniku jego oddziaływania z cząstkami glebowymi (Mamedov i in. 2016). Adsorpcja związku wielkocząsteczkowego na powierzchni składników fazy stałej gleby może prowadzić do stabilizacji istniejących agregatów i wzmocnienia wiązań pomiędzy sąsiadującymi ze sobą cząstkami minerału. Dzięki powyższym właściwościom PAM działa przeciwerozyjnie (Deng i in. 2006). Dodatkowo, może on wpływać na mobilność i dostępność biologiczną związków i substancji obecnych w glebie, w tym jonów metali ciężkich.

2. Materiał i Metody

Adsorbentem wykorzystywanym w badaniach był minerał ilasty, należący do grupy glinokrzemianów warstwowych – kaolinit (*Sigma-Aldrich*). Ma on budowę dwuwarstwową typu 1:1, w której warstwy glinotlenowa oraz krzemotlenowa są w sposób trwały połączone ze sobą (Miranda-Trevino i Coles 2003). Dwuwarstwowe pakiety łączą się za pomocą wiązań wodorowych, które skutecznie hamują powiększenie przestrzeni międzypakietowej i tym samym uniemożliwiają adsorpcję np. cząsteczek wody lub kationów w tym obszarze. W rezultacie zdolność sorpcyjna tego typu minerałów ilastych jest ograniczona tylko do powierzchni zewnętrznej.

Powierzchnię właściwą i porowatość adsorbentu wyznaczono metodą niskotemperaturowej adsorpcji/desorpcji azotu (*Micromeritics ASAP 2020 analyzer*). Badany minerał wykazuje słabo rozwiniętą powierzchnię właściwą, która wynosi 8,02 m²/g.

Jako adsorbaty wykorzystano poliakrylamidy jonowe o odmiennej masie cząsteczkowej i różnej zawartości grup funkcyjnych zdolnych do dysocjacji. Były to dwie odmiany polimeru anionowego (AN PAM) o masie cząsteczkowej równej 13 000 i 14 000 kDa oraz zawartości grup karboksylowych wynoszącej 5% i 30%, a także dwa poliakrylamidy kationowe (KT PAM) o masie cząsteczkowej równej 7 000 kDa, które zawierały 35% lub 80% czwartorzędowych grup aminowych.

Pomiary wielkości adsorpcji polimerów/jonów metali ciężkich na powierzchni kaolinitu oraz stabilności suspensji minerału ilastego w obecności wybranych adsorbatów przeprowadzone zostały w obecności elektrolitu podstawowego NaCl o stężeniu 0,001 mol/L, w temperaturze 25°C, dla dwóch wartości pH 5 i 7 ($\pm 0,1$). Wybrane wartości pH nawiązywały do powszechnie występujących odczynów gleb w Polsce. Dla próbek zawierających jony ołowiu pomiary wykonywano wyłącznie w pH 5 celem uniknięcia wytrącania wodorotlenku ołowiu w wyższych pH roztworu.

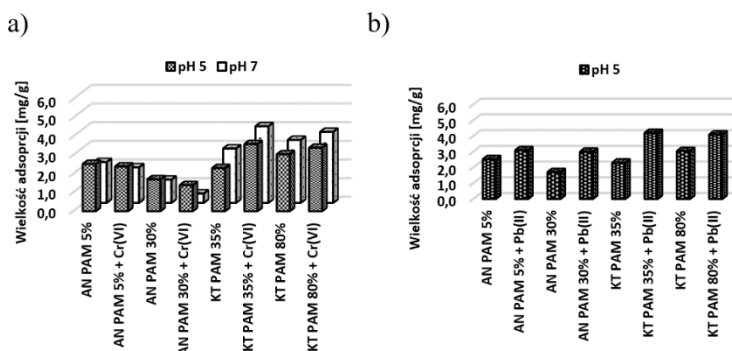
Wielkość adsorpcji poliakrylamidu oraz jonów metali ciężkich na powierzchni glinokrzemianu wyznaczono metodą statyczną, w oparciu o różnicę stężenia polimeru lub jonów metali w roztworze przed i po procesie adsorpcji. Wielkość adsorpcji poszczególnych adsorbatów zmierzono spektrofotometrycznie poprzez pomiar zabarwienia roztworu, powstałego jako wynik reakcji jonu/polimeru z odpowiednim wskaźnikiem. Intensywność barwnego produktu reakcji jest wprost proporcjonalna do stężenia związków wielkocząsteczkowych lub jonów metali. W oznaczeniach ilościowych wykorzystano: reakcję anionowego poliakryloamidu z hyaminą (Crummet i Hummel 1963), reakcję kationowego poliakryloamidu z żółcieniem brylantową w środowisku zasadowym (pH 9) (Ziółkowska i in. 2015), reakcję jonów ołowiu z 4-(2-pirydyloazo)-rezorcynolem z dodatkiem buforu o pH 10 (Dagnall i in. 1963) oraz reakcję jonów chromu(VI) z difenylkarbazydem (Gardner i Comber 2002). Stężenie polimeru i jonów metali oznaczano przy użyciu spektrofotometru Carry 1000 (*Varian*) przy długości fali 500nm (AN PAM), 495nm (KT PAM), 520nm (ołów) oraz 546nm (chrom). Pomiary wielkości adsorpcji rozpoczynano od przygotowania próbek zawierających odpowiednie objętości roztworów Cr(VI), Pb(II) i PAM zapewniających stężenie 100ppm (PAM) i 10 ppm (jony metali) oraz 0,1g kaolinitu. Następnie

ustalono pH badanych próbek do wartości 5 lub 7 i tak sporządzone suspensje wytrząsano w łaźni wodnej przez 24 godziny. Po upływie tego czasu roztwory odwirowano, a następnie pobierano klarowny roztwór do oznaczania spektrofotometrycznego.

Stabilność suspensji kaolinitu, bez i w obecności poliakrylamidu jonowego i/lub jonów metali ciężkich określono na podstawie zmian zmętnienia układu w czasie mierzonych przy użyciu turbidymetru (AN1000, *Hach*). Na początku sporządzano suspensje minerału ilastego poprzez dodanie ciała stałego (0,05 g) do roztworu zawierającego elektrolit podstawowy. Następnie suspensje poddawano działaniu ultradźwięków przez 3 minuty, dodawano wybrany adsorbat lub dwa adsorbaty jednocześnie i ustalano pH układu. Mętność układu mierzono po 0, 2, 5, 10, 30, 60 i 90 minutach od rozpoczęcia pomiaru.

3. Wyniki i dyskusja

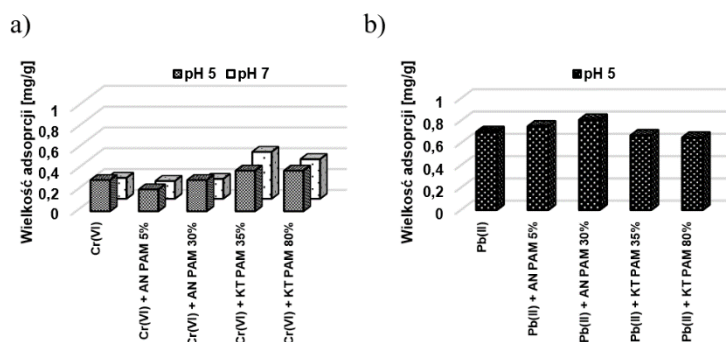
Analiza wyników pomiarów adsorpcyjnych wykazała, że wszystkie rodzaje poliakryloamidu jonowego oraz oba metale ciężkie adsorbują się na powierzchni kaolinitu. Jednakże, wielkość ich adsorpcji jest ściśle uzależniona od tego, czy w układzie obecny był tylko jeden adsorbat, czy dwa adsorbaty jednocześnie. Rys.1 przedstawia wielkość adsorpcji anionowego i kationowego poliakryloamidu na powierzchni wybranego minerału ilastego bez i w obecności jonów ołowiu(II) lub chromu(VI). Z kolei Rys. 2 obrazuje ilość zaadsorbowanych jonów Pb(II) i Cr(VI) na powierzchni kaolinitu bez i w obecności jonowych flokulantów.



Rys. 1. Wpływ obecności jonów Cr(VI) (a) i Pb(II) (b) na wielkość adsorpcji poliakryloamidu jonowego na powierzchni kaolinitu w różnych pH roztworu.

Dodatek jonów Cr(VI) zwiększa ilość zaadsorbowanego poliakryloamidu kationowego, natomiast zmniejsza wielkość adsorpcji polimeru anionowego. Różnorodny wpływ polimeru podyktowany jest odmiennym charakterem oddziaływań występujących w układzie. W przypadku układu zawierającego jednocześnie AN PAM i jony Cr(VI) między anionami CrO_4^{2-} lub $HCrO_4^-$ a zdysocjowanymi grupami karboksylowymi polimeru anionowego występuje odpychanie elektrostatyczne, które ogranicza kontakt polimeru z powierzchnią ciała stałego. Natomiast w układzie zawierającym jednocześnie KT PAM i jony Cr(VI) pomiędzy anionami chromu i dodatnio naładowanymi grupami aminowymi polimeru działają siły przyciągania elektrostatycznego, które sprzyjają adsorpcji związku wielkocząsteczkowego na powierzchni kaolinitu.

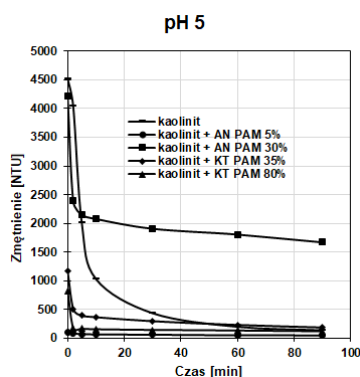
Obecność jonów ołowiu(II), występujących w roztworze w formie kationów Pb^{2+} , przyczynia się do wzrostu wielkości adsorpcji zarówno polimeru anionowego, jak i kationowego. Jest to związane z możliwością tworzenia połączeń kompleksowych między jonami Pb(II) i zdysocjowanymi grupami karboksylowymi polimeru. W przypadku kationowego polimeru posiadającego dodatnie czwartorzędowe grupy aminowe w makrocząsteczce, oddziaływanie jonów ołowiu jest ograniczone ze względu na obecność odpychania elektrostatycznego. Niemniej jednak istnieje możliwość tworzenia wiązań kowalencyjnych kationów Pb^{2+} z grupami amidowymi makrocząsteczek PAM (Gu i in. 2018).



Rys. 2. Wpływ obecności poliakryloamidu jonowego na wielkość adsorpcji Cr(VI) i Pb(II) na powierzchni kaolinitu w różnych pH roztworu.

Dodatek anionowego i kationowego flokulanta do układu powoduje zwiększenie akumulacji jonów metali ciężkich na powierzchni kaolinitu w wybranych przypadkach. Gdy do suspensji wprowadzony jest kationowy PAM, wielkość adsorpcji jonów chromu(VI) jest większa. Natomiast gdy dodany zostaje anionowy PAM – zwiększa się adsorpcja jonów ołowiu(II). Jest to ściśle związane z tworzeniem się kompleksów metali ciężkich z makrocząsteczkami PAM. Łańcuchy polimerowe skutecznie wychwytyją jony z roztworu wodnego. Tworzenie kompleksu Pb(II)-AN PAM jest prawdopodobnie podyktowane przyciąganiem elektrostatycznym obecnym między kationem ołowiu a zdysocjowanymi grupami karboksylowymi. Z kolei tworzenie kompleksu Cr(VI)-KT PAM wiąże się z przyciąganiem elektrostatycznym występującym pomiędzy ujemnymi jonami chromu a dodatnimi segmentami polimerowymi zawierającymi czwartorzędowe grupy aminowe. Innym możliwym mechanizmem odpowiedzialnym za wiązanie Cr(VI) przez makrocząsteczki polimerowe może być tworzenie wiązań wodorowych między amidowymi grupami PAM a jonami chromu(VI) (Zhang i in. 2012).

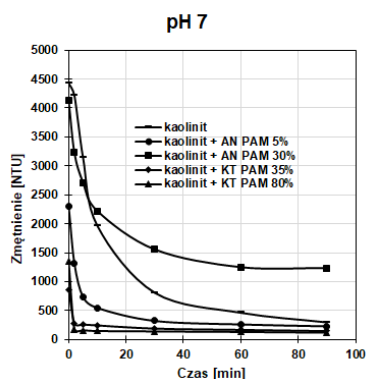
Zmiany mętności suspensji kaolinitu w czasie bez i w obecności poliakryloamidu jonowego i/lub jonów metali ciężkich w pH 5 i 7 przedstawiono na Rys.3-10.



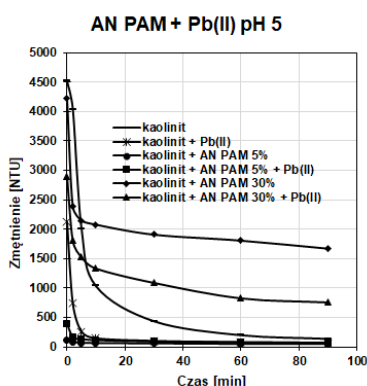
Rys. 3. Zmiany zmętnienia suspensji kaolinitu w czasie w pH 5 bez i w obecności PAM jonowego.

Zmętnienie suspensji kaolinitu bez polimeru zmniejsza się powoli, co świadczy o stosunkowo dużej stabilności układu. Ze względu na wysoki ujemny ładunek powierzchniowy kaolinitu pomiędzy jego cząstkami występuje odpychanie elektrostatyczne. W rezultacie tworzenie agregatów ciała stałego jest znacznie ograniczone. Obecność jonowych poliakryloamidów wpływa na stabilność zawiesiny minerału. W przypadku obu kationowych PAM i anionowego PAM zawierającego 5% grup karboksylowych, po 5 minutach od ich dodania zmętnienie układu jest kilka razy mniejsze niż zawiesiny kaolinitu bez dodatku. Oznacza to, że adsorpcja tych polimerów na

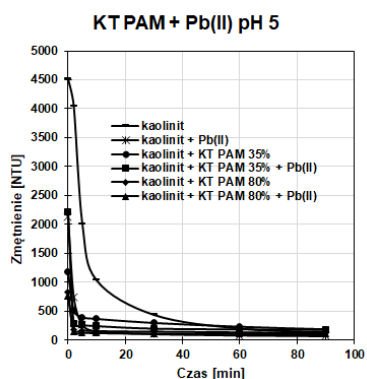
powierzchni kaolinitu sprzyja tworzeniu dużych agregatów, które opadają na dno fiolki pomiarowej. W układzie zachodzi flokulacja. Z drugiej zaś strony, adsorpcja poliakryloamidu anionowego zawierającego 30% grup karboksylowych powoduje wzrost stabilności suspensji. W obecności tego polimeru mętność suspensji kaolinitu jest większa od mętności zaobserwowanej bez flokulanta. Jest to prawdopodobnie związane z odpychaniem elektrosterycznym występującym pomiędzy cząstkami kaolinitu pokrytymi ujemnie naładowanymi warstwami polimerowymi.



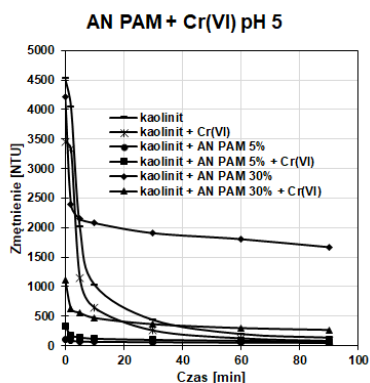
Rys. 4. Zmiany zmętnienia suspensji kaolinitu w czasie w pH 7 bez i w obecności PAM jonowego.



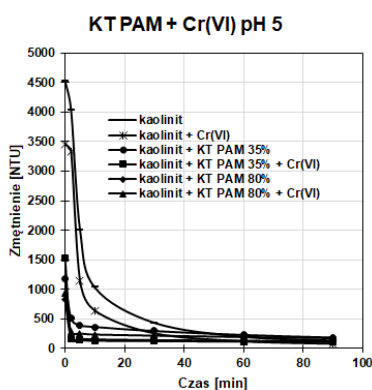
Rys. 5. Wpływ obecności jonów ołowiu(II) na zmętnienie układu kaolinit/PAM anionowy w pH 5.



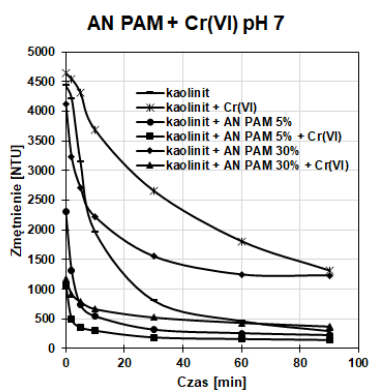
Rys. 6. Wpływ obecności jonów ołowiu(II) na zmętnienie układu kaolinit/PAM kationowy w pH 5.



Rys. 7. Wpływ obecności jonów chromu(VI) na zmętnienie układu kaolinit/PAM anionowy w pH 5.

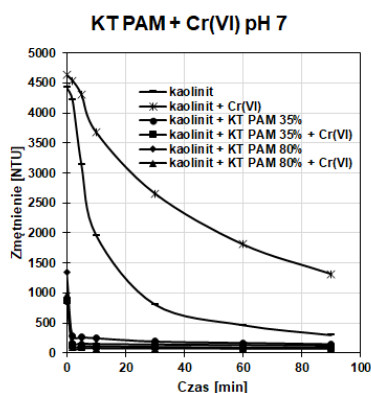


Rys. 8. Wpływ obecności jonów chromu(VI) na zmętnienie układu kaolinit/PAM kationowy w pH 5.



Rys. 9. Wpływ obecności jonów chromu(VI) na zmętnienie układu kaolinit/PAM anionowy w pH 7.

Wyniki zaobserwowane dla układów zawierających jonowy PAM oraz jony metali ciężkich jednocześnie są podobne do tych odnotowanych dla układów zawierających tylko PAM. Oznacza to, że oba poliakrylamidy kationowe oraz poliakrylamid anionowy zawierający 5% grup karboksylowych zachowują zdolności flokulacyjne w obecności metali ciężkich.



Rys. 10. Wpływ obecności jonów chromu(VI) na zmętnienie układu kaolinit/PAM kationowy w pH 7.

4. Wnioski

Na podstawie otrzymanych wyników można sformułować następujące wnioski:

- (1) Jony ołowiu(II) przyczyniają się do wzrostu wielkości adsorpcji wszystkich rodzajów poliakryloamidu na powierzchni kaolinitu, natomiast jony chromu(VI) powodują wzrost wielkości adsorpcji poliakryloamidów kationowych oraz spadek wielkości adsorpcji poliakryloamidów anionowych.
- (2) Poliakryloamidy kationowe zwiększają ilość zaadsorbowanych jonów chromu(VI) na powierzchni kaolinitu, natomiast poliakryloamidy anionowe powodują wzrost wielkości adsorpcji jonów ołowiu(II).
- (3) Obecność jonowego poliakryloamidu i jonów metali ciężkich wpływa na stabilność (zmętnienie) suspensji kaolinitu.
- (4) Poliakrylamidy kationowe oraz poliakrylamid anionowy zawierający 5% grup karboksylowych powodują silną destabilizację suspensji kaolinitu.
- (5) Poliakryloamid anionowy zawierający 30% grup karboksylowych przyczynia się do wzrostu stabilności suspensji minerału ilastego.
- (5) Jony chromu(VI) i ołowiu(II) nie ograniczają zdolności flokulacyjnych badanych związków wielkocząsteczkowych.

5. Literatura

- Adachi Y (2019) Aspects of colloid and interface in the engineering science of soil and water with emphasis on the flocculation behavior of model particles. *Paddy and Water Environment* 17: 203-210
- Al-Hashmi AR, Luckman PF (2010) Characterization of the adsorption of high molecular weight non-ionic and cationic polyacrylamide on glass from aqueous solutions using modified atomic force microscopy. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 358: 142-148
- Craciun G, Ighigeanu D, Manaila E, Stelescu MD (2015) Synthesis and Characterization of Poly(Acrylamide-Co-Acrylic Acid) Flocculant Obtained by Electron Beam Irradiation. *Materials Research* 18(5): 984-993
- Crummett WB, Hummel RA (1963) The determination of traces of polyacrylamides in water. *Journal - American Water Works Association* 1: 209-219
- Dagnall RM, West TS, Young P (1965) Determination of lead with 4-(2-pyridylazo)-resorcinol II: Application to steel, brass and bronze. *Talanta* 12: 583-588
- De Boedt MF (1993) Soil conditioning, a modern procedure for restoring physical soil degradation. *Pedologie* 43: 157-195

- Deng Y, Dixon JB, White GN (2006) Adsorption of Polyacrylamide on Smectite, Illite, and Kaolinite. *Soil Science Society of America Journal* 70: 297-304
- Gardner M, Comber S (2002) Determination of trace concentrations of hexavalent chromium. *Analyst* 127: 153-156
- Gu S, Wang L, Mao X, Yang L, Wang C (2018) Selective adsorption of Pb(II) from aqueous solution by triethylenetetramine-grafted polyacrylamide/vermiculite. *Materials* 11(4): 514-534
- Guezennec AG, Michel C, Bru K, Touze S, Desroche N, Mnif I, Motelica-Heino M (2015) Transfer and degradation of polyacrylamide-based flocculants in hydrosystems: a review. *Environmental Science and Pollution Research* 22: 6390–6406
- Kadajji VG, Betageri GV (2011) Water Soluble Polymers for Pharmaceutical Applications. *Polymers* 3: 1972-2009
- Kang J, Sowers TD, Duckworth OW, Amoozegar A, Heitman JL, McLaughlin RA (2013) Turbidimetric Determination of Anionic Polyacrylamide in Low Carbon Soil Extracts. *Journal of Environmental Quality* 42: 1902-1907
- Mamedov AI, Huang C, Aliev FA, Levy GJ (2016) Aggregate Stability and Water Retention Near Saturation Characteristics as Affected by Soil Texture, Aggregate Size and Polyacrylamide Application. *Land Degradation & Development* 28: 543– 552
- Miranda-Trevino JC, Coles AC (2003) Kaolinite properties, structure and influence of metal retention on pH. *Applied Clay Science* 23: 133-139
- Myagchenkov VA, Kurenkov VF (1991) Applications of Acrylamide Polymers and Copolymers: A Review. *Polymer-Plastics Technology and Materials* 30(2-3): 109-135
- Nowicki W, Nowicka G (2001) Effect of Polymers on Properties of Dispersions of Nanoparticles. *Wiadomości Chemiczne* 55: 549-567
- Shatat RS, Niazi SK, Batati FSA (2018) Synthetic Polyelectrolytes Based on Polyacrylamide: Non-ionic, Anionic and Cationic Polyacrylamides and Their Applications in Water and Wastewater Treatment: Literature Review. *Chemical Science International Journal* 25(4): 1-8
- Ziółkowska DM, Zalewski T, Shyichuk O (2015) Sposób oznaczania stężenia poli(chloroku diallilodimetyloamonowego) w roztworach wodnych. zgł. pat. P. 229689, pat. PL 229689
- Zhang D, Ma D, Feng H, Hao Y (2012) Adsorption of Cr(VI) from aqueous solution using carbon-microsilica composite adsorbent. *Journal of the Chilean Chemical Society* 57: 964–968

3. Wyznaczanie wydajności procesu utleniania wody morskiej do wolnego chloru na fotoanodach z mezoporowatego tlenku wolframu(VI)

Determination of seawater to free chlorine oxidation efficiency on mesoporous tungsten(VI) oxide photoanodes

Jadwiszczak Michał

Centrum Nowych Technologii, Uniwersytet Warszawski

Opiekun naukowy: dr hab. Renata Solarzka

Jadwiszczak Michał: m.jadwiszczak@student.uw.edu.pl

Słowa Kluczowe: oranż metylowy, N,N-dietylo-*p*-fenylenodiamina, spektrofotometria, fotoelektrochemia

Streszczenie

Podczas elektrolizy wody morskiej na anodach zachodzą dwa konkurencyjne procesy: utlenianie cząsteczek wody do pierwiastkowego tlenu oraz utlenianie anionów chlorkowych do pierwiastkowego chloru. Elektroliza jest procesem energochłonnym i dlatego intensywnie badane są ogniwa, wykorzystujące energię słoneczną np. do rozkładu wody w procesie fotoelektrochemicznym. Celem badań było ustalenie procedur pomiarowych, pozwalających na wyznaczenie wydajności wydzielania chloru na anodach różnego rodzaju, ze szczególnym uwzględnieniem fotoanod z nanostrukturalnego tlenku wolframu(VI). Opracowana metoda analityczna opierała się o reakcje chloru ze związkami organicznymi, w szczególności z oranżem metylowym i N,N-dietylo-*p*-fenylenodiaminą (DPD). Reakcjom tym towarzyszą zmiany absorpcji promieniowania w zakresie światła widzialnego i bliskiego ultrafioletu, które mogą być rejestrowane i interpretowane ilościowo. W pierwszej kolejności wyznaczone zostały współczynniki absorpcji używanych indykatorów. Dla oranżu metylowego o pH = 2, dla długości fali 510 nm: $\epsilon = 46000 \pm 1000 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, dla DPD, dla długości fali 552 nm: $\epsilon = 23000 \pm 2000 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Ostatecznym celem badań był pomiar stężenia chloru w przedziale anodowym po fotoelektrolizie wodnego roztworu chlorku sodu zakwaszonego do pH = 2 i porównania otrzymanej wartości z wartością teoretyczną przy maksymalnej wydajności. Doświadczenie potwierdziło, że głównym produktem (70%) wydzielanym na fotoanodzie z tlenku wolframu(VI) jest chlor.

1. Wstęp

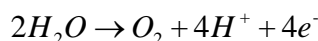
W obecnych czasach trwają intensywne poszukiwania wydajnych i ekonomicznych źródeł energii, które mogłyby zastąpić konwencjonalne paliwa kopalne. Jedną z koncepcji jest wykorzystanie energii słonecznej poprzez rozkład wody w ogniwach fotoelektrochemicznych z elektrodami półprzewodnikowymi. Produktami rozkładu byłyby wodór i tlen, zatem energia słoneczna byłaby magazynowana w postaci energii wiązań chemicznych w wodrze, który następnie może być wykorzystywany jako paliwo. Zasada działania ogniwa fotoelektrochemicznego jest bardzo prosta, główna idea bazuje na pasmowej budowie półprzewodników. Foton o odpowiedniej energii powoduje w półprzewodniku wzbudzenie elektronu z pasma walencyjnego do pasma przewodnictwa, czyli generuje parę elektron-dziura. Tak powstała para może ulec oczywiście rekombinacji, ale pożądanym stanem jest dobra separacja ładunków, a następnie oddziaływanie z elektrolitem. Dziura, po migracji do powierzchni półprzewodnika, może utlenić składniki elektrolitu (np. wodę do pierwiastkowego tlenu), a wzbudzony elektron może zredukować składniki elektrolitu (np. kationy wodoru do pierwiastkowego wodoru). Procesy utleniania i redukcji zawsze są rozdzielone w przestrzeni na dwie elektrody umieszczone w dwóch przedziałach ogniwa fotoelektrochemicznego. Schematycznie układ taki jest przedstawiony na Rys.4. Przyłożona dodatkowa różnica potencjałów między elektrodami ułatwia separację ładunków, przez co zwiększa wydajność procesu fotoelektrochemicznego.

Półprzewodniki do procesu fotoelektrochemicznego muszą charakteryzować się odpowiednią szerokością przerwy wzbronionej – wystarczająco dużą, aby dziury i elektrony miały odpowiednią energię do utlenienia składników elektrolitu, a jednocześnie odpowiednio małą, aby

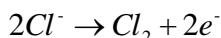
móc absorbować jak największą część promieniowania z zakresu widzialnego, a nie tylko ultrafiolet, którego w świetle słonecznym na powierzchni morza jest stosunkowo niewiele. Ponadto wygenerowane nośniki ładunku muszą mieć wystarczająco długi czas życia, a sam materiał powinien być jednocześnie jak najbardziej odporny na korozję i fotokorozję.

Jedną z ważnych grup półprzewodników stosowanych w ogniwach fotoelektrochemicznych są tlenki metali przejściowych, zaczynając od dwutlenku tytanu (Fujishima i Honda, 1972). Spośród nich, bardzo obiecujące właściwości wykazuje tlenek wolframu(VI). Dodatkowo, stosunkowo prosta synteza (Santato i in. 2001) powoduje, że jest on materiałem popularnym w fotoelektrochemii. Tlenek wolframu(VI) krystalizujący w układzie jednoskośnym ma przerwę wzbronioną o szerokości ok. 2,5 eV, co pozwala na absorpcję przez ten materiał promieniowania o długości fali do 500 nm, z maksimum w zakresie światła fioletowego o długości ok. 400 nm. (Santato i in. 2001). Tlenek wolframu(VI) jest stabilny w roztworach o pH mniejszym niż 4 (Pourbaix, 1963), w roztworach obojętnych i alkalicznych ulega łatwo rozтворzeniu do wolframianów(VI). Fotoanody z tlenku wolframu(VI) sprawdzają się zatem dobrze do rozkładu wody w wodnych roztworach kwasów, szczególnie w roztworze kwasu metanosulfonowego (Solarska i in. 2012), gdzie tlen jest jedynym produktem utleniania i nie powstają nadtlenki, mogące zatruwać powierzchnię elektrody.

Jako elektrolit w fotoelektrochemii jest również wykorzystywana woda morska, jest to bardzo obiecujący elektrolit w procesach fotoelektrochemicznych jako bardzo łatwo dostępna i tania alternatywa dla klasycznych elektrolitów (Luo i in. 2011). W elektrolicie tym zachodzą głównie dwie konkurencyjne reakcje utleniania: czteroelektronowa reakcja utleniania wody do tlenu ($E = 1,23 \text{ V}$):

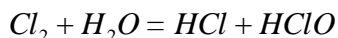


oraz dwuelektronowa reakcja utleniania anionów chlorkowych do chloru ($E = 1,36 \text{ V}$).

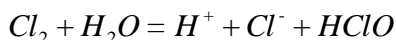


W literaturze naukowej niewiele jest doniesień ilościowych na temat wydajności wydzielania chloru i tlenu, stąd też zespół nasz rozszerzył charakterystykę wytwarzanych elektrod o te pomiary, których szczegóły opisane są w dalszej części tekstu.

Woda morska, która jest głównie roztworem chlorku sodu, ma odczyn obojętny, więc ma zbyt wysokie pH, aby WO_3 był stabilny w kontakcie z nią. Jednakże powstający na fotoanodzie chlor ulega w wodzie odwracalnej reakcji dysproporcjonowania według równania:



Powstają w jej wyniku mocny kwas chlorowodorowy oraz słaby kwas chlorowy(I), $pK_a = 7,5$ (Harris i Daniel, 2009). Można zatem zapisać równanie reakcji w formie jonowej:



Przy pominięciu ewentualnych reakcji pobocznych, można oszacować lokalne pH przy fotoanodzie. Stężenia substancji połączone są ze sobą stałą równowagi (Connick i Chia 1959):

$$K = \frac{[H^+][Cl^-][HClO]}{[Cl_2]} = 4 \cdot 10^{-4}$$

Do obliczeń zostało przyjęte najmniejsze znalezione w literaturze (Whitney i Vivian, 1941) stężenie cząstkowe chloru równe 0,067 atm, któremu odpowiada stężenie chloru w roztworze równe 1,12 g na kilogram wody (czyli około 0,0158 mol dm^{-3}). Wraz ze wzrostem stężenia chlorku sodu rozpuszczalność chloru w wodzie maleje (Whitney i Vivian, 1941) i w przypadku roztworu chlorku sodu o stężeniu 0,5 M powinna być o około 30% mniejsza niż w przypadku czystej wody. Zatem w obliczeniach możemy przyjąć stężenie chloru równe 0,011 M. Jako że kationy wodoru pochodzą w większości z dysocjacji HCl, możemy założyć, że w roztworze wodnym stężenie cząsteczek chloru,

które przereagowały z wodą wynosi x , zatem stężenie kationów wodoru w roztworze wynosi x , podobnie jak stężenie kwasu chlorowego(I). Stężenie anionów chlorkowych wynosi, zatem $0,5 + x$ (ze względu na obecność $0,5 \text{ M NaCl}$), a stężenie cząsteczkowego chloru wynosi $0,011 - x$. Po podstawieniu do wzoru na stałą równowagi otrzymujemy równanie:

$$K = \frac{x \cdot (x + 0,5) \cdot x}{0,0112 - x} = 4 \cdot 10^{-4}$$

Jedynym pierwiastkiem tego równania, który spełnia założenia ($x > 0$ oraz $x < 0,011$) jest $x = 0,0026$, zatem stężenie kationów wodoru wynosi: $[\text{H}^+] = 0,0026$, co odpowiada $\text{pH} = 2,6$, a stężenie równowagowe chloru wynosi około $0,0083 \text{ M}$. W pracach elektrody stężenie chloru jest zapewne wyższe, tak samo jak ciśnienie cząstkowe chloru, więc wartość pH może być jeszcze niższa. Widać zatem wyraźnie, że lokalne niskie pH pozwala na zachowanie trwałości WO_3 mimo wyższego pH w całej objętości elektrolitu. Istotnie, podczas dłuższej pracy ogniwa w takim elektrolicie następuje stabilizacja fotoprądu płynącego w ogniwie. Przy krótkich pomiarach jednak stosowany był roztwór NaCl zakwaszony do $\text{pH} = 2$ (symulujący warunki po pewnym czasie elektrolizy), aby zapewnić stabilną pracę fotoanody od samego początku.

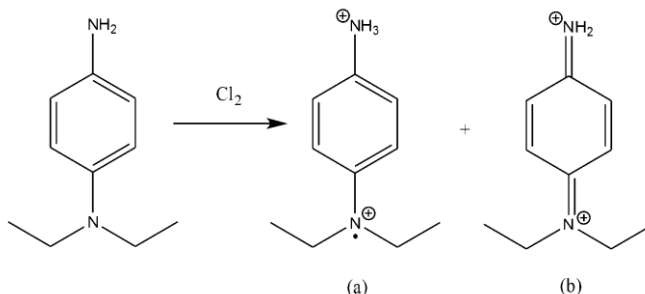
2. Materiał i metody

Przygotowanie elektrod. Koloid WO_3 został otrzymany zmodyfikowaną metodą zol-żel opisaną w literaturze (Santato i in. 2001), używając wolframianu(VI) sodu jako prekursora. Do zregenerowanej za pomocą $1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ kolumny wypełnionej żywicą kationowymienną (Dowex 50 WX2-200) wprowadzono $0,5 \text{ M}$ roztwór wolframianu(VI) sodu. Gdy eluat nabrał odczynu kwaśnego (względem papierka wskaźnikowego), zaczęto zbierać wyciek do kolby kulistej zawierającej 20 ml etanolu i element mieszający, mieszając powoli. Etanol spełnia funkcje stabilizatora metastabilnego kwasu wolframowego(VI). Kolumnę eluowano wodą aż do momentu, kiedy cały kwas wolframowy(VI) został wyeluowany – odczyn eluatu stał się bliski obojętnego. Uzyskaną w kolbie mieszaninę (żółty klarowny roztwór) zateżono na wyparce obrotowej do objętości około 20 ml . Do powstałego roztworu dodano 5 ml glikolu polietylenowego (PEG-300). Glikol polietylenowy (PEG 300) jest medium pozwalającym odpowiednio ukierunkować cząsteczki kwasu wolframowego(VI) w procesie powstawania nanocząstek, co owocuje zapewnieniem odpowiedniej porowatości i rozmiaru nanocząstek tlenku wolframu(VI). Kolbę okryto szczelnie folią aluminiową (aby uchronić reagenty przed degradacją pod wpływem światła) i pozostawiono na całą noc, mieszając. Następnego dnia na wyczyszczone kawałki szkła przewodzącego, FTO (*fluorine-doped tin oxide*) nałożono kilkadziesiąt mikrolitrów koloidu WO_3 i rozprowadzono w równomierną warstwę (metodą *doctor blade*). Tak otrzymaną warstwę poddano obróbce termicznej wewnątrz pieca rurowego, w temperaturze 550°C przez ok. 25 minut , w przepływie tlenu. Atmosfera utleniająca pozwala zredukować zbędne defekty (wakancje tlenowe), które mogłyby pułapkować elektrony. W temperaturze 550°C glikol polietylenowy ulega całkowitemu spalaniu, pozostaje warstwa mezoporowatego WO_3 o grubości około $0,5 \mu\text{m}$ i wysokim stopniu krystalizacji (układ jednoskośny). Na wypaloną warstwę WO_3 nakładano kolejne warstwy według tej samej procedury, otrzymano elektrody 1, 3, i 6-warstwowe. Otrzymane nanocząstki tlenku wolframu(VI) mają średnie rozmiary rzędu 30 nm .

Krzywe wzorocwe i wyznaczenie współczynników absorpcji. Pierwiastkowy chlor, podobnie jak aniony chloranowe(I) nie ma zbyt silnych pasm absorpcji w zakresie światła widzialnego i bliskiego ultrafioletu, jedynie mało intensywne pasmo w okolicy fal o długości 325 nm . Aby metody spektrofotometryczne miały odpowiednią czułość, musi być użyty dodatkowy indykator. W toku naszych badań przeprowadziliśmy badania z wykorzystaniem N,N -dietylo-p-fenylenodiaminy (DPD) oraz oranżu metylowego.

DPD jest związkami bezbarwnym. W reakcji z chlorem ulega natomiast utlenieniu do rodników o barwie malinowej (Rys.1a) lub do bezbarwnej iminy (Rys.1b). W przypadku małych

stężen chloru (rzędu kilku-kilkudziesięciu ppm) związek barwny jest praktycznie jedynym produktem reakcji. DPD reaguje zarówno z kwasem chlorowym(I), jak też anionami chloranowymi(I). W widmie UV-Vis barwnego produktu są dwa intensywne pasma absorpcji w zakresie światła widzialnego, mające maksima przy długościach fali: 510 i 552 nm (Rys.2a). Pasma 552 nm jest nieco bardziej intensywne i z tego powodu to właśnie dla niego został wyznaczony współczynnik absorpcji.



Rys. 1. Produkty reakcji utleniania DPD chlorem

Do analiz używany był siarczan N,N-Dietylo-p-fenylenodiaminy w postaci roztworu wodnego o stężeniu 0,01 M. Jest to stężenie wielokrotnie przewyższające ewentualne stężenia chloru w badanych roztworach, w celu uniknięcia ewentualnych reakcji następczych ze związkiem barwnym. Odpowiednie pH mieszaniny zapewniała obecność bufora fosforanowego (H_3PO_4/NaH_2PO_4) o pH około 2. Bufor ten zapewnił jednakowe warunki podczas pomiarów wzorca (roztwór lekko alkaliczny) oraz pomiarów roztworu po elektrolizie (roztwór kwaśny), a utrzymywane niskie pH zapobiegało niekontrolowanemu utlenianiu indykatora (w środowisku alkalicznym, kiedy część DPD występuje w postaci wolnej aminy, następują niepożądane reakcje z tlenem atmosferycznym owocujące ciemnieniem roztworu).

Do tak przygotowanego roztworu wprowadzono roztwór wzorcowy chloru (Hach reagent) o całkowitym stężeniu chloru równym, 27 ± 0.357 mg/L. Roztwór wzorca dodawano porcjami po 0,1 ml do 100 ml buforowanego roztworu DPD. Natychmiast po dodaniu wzorca i wymieszaniu roztworu, była mierzona trzykrotnie absorbancja roztworu dla długości fali 552 nm (w kuwetach kwarcowych o długości drogi optycznej $l = 1$ cm). Następnie dla każdego stężenia została obliczona średnia wartość absorbancji, a następnie współczynnik absorpcji z prawa Lamberta-Beera:

$$A = \epsilon cl$$

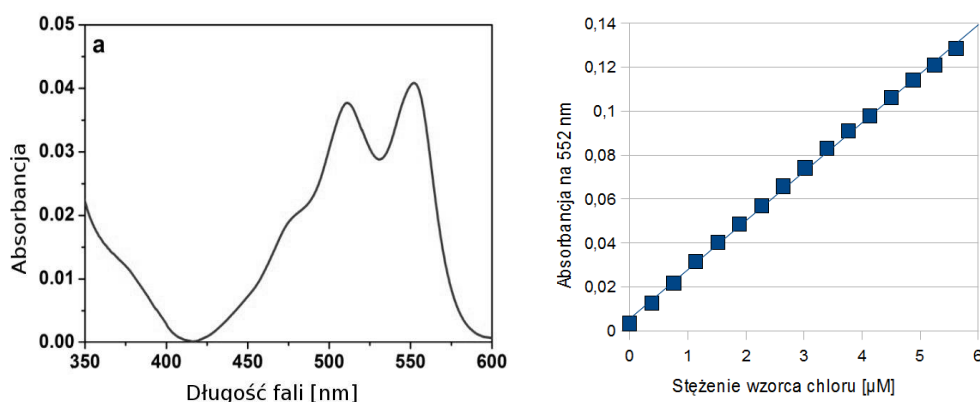
Gdzie: A to wartość absorbancji, ϵ to współczynnik absorpcji, c to stężenie chloru, l to długość drogi optycznej

Wyniki pomiarów i wartości obliczonych współczynników absorpcji zawiera Tab.1. Średni współczynnik absorpcji dla długości fali 552 nm wynosi $\epsilon = 23000 \pm 2000$ dm³ mol⁻¹ cm⁻¹. Wartość absorbancji dobrze koreluje ze stężeniem chloru w roztworze, współczynnik korelacji prostej do wykresu zależności absorbancji na długości fali 552 nm od stężenia wzorca w badanym roztworze wynosi $R^2 = 0,999$ (Rys.2).

Oranż metylowy (Rys.3a) jest związkiem zawierającym w cząsteczce ugrupowanie azowe, czyli dwa atomy azotu połączone wiązaniem podwójnym. Jest ono ponadto sprzężone z dwoma pierścieniami aromatycznymi, tworząc dość duży układ sprzężony, co owocuje intensywnie pomarańczową (bądź czerwoną w środowisku kwaśnym) barwą. W zakresie światła widzialnego substancja ta ma bardzo intensywne i szerokie pasmo absorpcji, z maksimum dla długości fali ok. 460 nm. W środowisku kwaśnym (Rys.3) pasmo absorpcji formy sprotonowanej przesuwają się w stronę fal dłuższych (maksimum przy około 510 nm), a jego intensywność jeszcze bardziej rośnie. Związkiem o bardzo podobnej budowie do oranżu metylowego jest czerwień metylowa (Rys.3b). Może być ona z powodzeniem stosowana jako zamiennik oranżu metylowego do określania stężenia chloru.

Tab. 1. Wyniki pomiarów absorpcji roztworów indykatora dla różnych stężeń wzorca chloru i obliczone współczynniki absorpcji indykatora dla długości fali 552 nm.

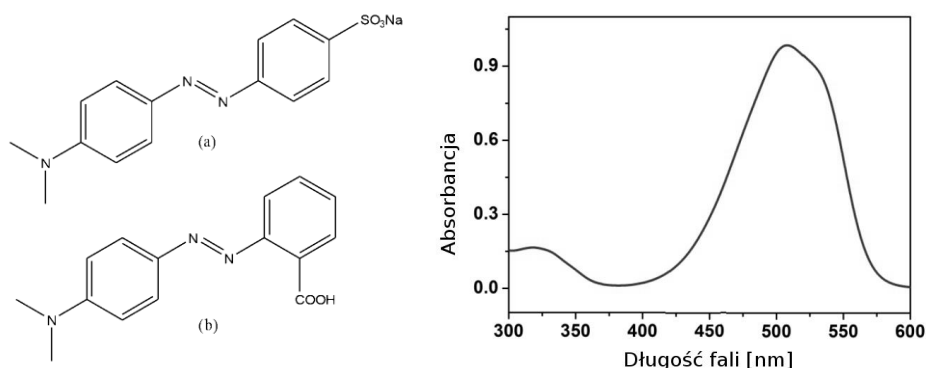
V _{wzorca} [ml]	C _{Cl₂} [μM]	V _{całkowita} [ml]	Absorbancja na 552 nm				Współczynnik absorpcji [dm ³ mol ⁻¹ cm ⁻¹]
			Pomiar 1	Pomiar 2	Pomiar 3	Średnia	
0,0	0,000	100,0	0,0035	0,0033	0,0031	0,0033	-
0,1	0,380	100,1	0,0123	0,0130	0,0123	0,0125	24305
0,2	0,759	100,2	0,0218	0,0218	0,0218	0,0218	24373
0,3	1,137	100,3	0,0308	0,0325	0,0311	0,0315	24763
0,4	1,515	100,4	0,0400	0,0405	0,0400	0,0402	24333
0,5	1,892	100,5	0,0486	0,0487	0,0483	0,0485	23908
0,6	2,268	100,6	0,0568	0,0572	0,0563	0,0568	23574
0,7	2,643	100,7	0,0656	0,0656	0,0663	0,0658	23656
0,8	3,018	100,8	0,0744	0,0744	0,0739	0,0742	23503
0,9	3,392	100,9	0,0827	0,0847	0,0821	0,0832	23546
1,0	3,765	101,0	0,0911	0,0910	0,0905	0,0909	23257
1,1	4,138	101,1	0,0986	0,0974	0,0977	0,0979	22864
1,2	4,509	101,2	0,1063	0,1061	0,1061	0,1062	22812
1,3	4,880	101,3	0,1144	0,1151	0,1135	0,1143	22752
1,4	5,250	101,4	0,1212	0,1210	0,1206	0,1209	22404
1,5	5,620	101,5	0,1280	0,1284	0,1290	0,1285	22272



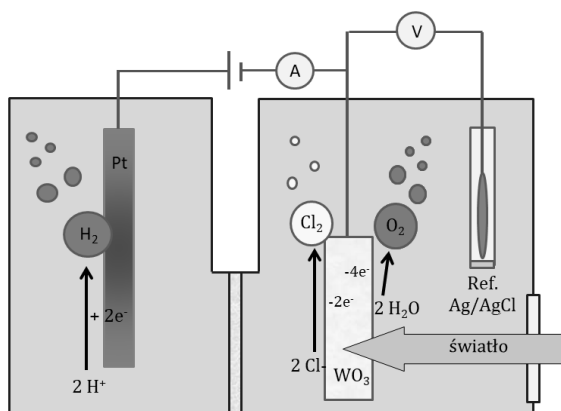
Rys. 2. Widmo UV-Vis barwnego produktu reakcji DPD z chlorem (a) i zależność absorpcji jego roztworów od stężenia wzorca chloru.

Wszystkie związki azowe reagują z chlorem, w wyniku czego zrywane jest połączenie azowe, układ jest rozprzęgany, a produkty są bezbarwne. Mierząc spadek absorpcji roztworu jesteśmy w stanie określić, jaka liczba moli związku azowego (a więc równocześnie jaka liczba moli chloru) uległa reakcji, przez co możemy określić ilość chloru w badanym roztworze. W celu wyznaczenia współczynnika absorpcji oranżu metylowego przygotowano kilka odważek soli sodowej

oranżu metylowego (2,9 mg, 5,9 mg, 10,4 mg), które zostały następnie rozarte z chlorkiem soli w celu ułatwienia rozpuszczania barwnika w wodzie. Z odważek tych przygotowano roztwory wzorcowe. Następnie zmierzono absorbancję tych roztworów i kilku ich rozcieńczeń na długości fali 460 nm. Otrzymana średnia wartość współczynnika absorpcji (obliczona z prawa Lamberta-Beera) dla oranżu metylowego w pH = 7 wyniosła: $\epsilon = 26500 \pm 500 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Następnie przygotowano z roztworów wzorcowych roztwory oranżu metylowego zakwaszone kwasem solnym do pH = 2 (taka sama wartość pH jak w używanym elektrolicie w ogniwie fotoelektrochemicznym). Następnie zmierzono absorbancję tych roztworów i kilku ich rozcieńczeń na długości fali 510 nm. Otrzymana średnia wartość współczynnika absorpcji dla oranżu metylowego w pH = 2 wyniosła: $\epsilon = 46000 \pm 1000 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Po zmierzeniu absorbancji dla kilku różnych rozcieńczeń wybranych roztworów stwierdzono bardzo dobrą korelację liniową między stężeniem oranżu metylowego a absorbancją roztworu.



Rys. 3. Struktura oranżu metylowego (a) oraz czerwieni metylowej (b) oraz widmo UV-Vis oranżu metylowego w roztworze o pH = 2.



Rys. 4. Schemat celi fotoelektrochemicznej.

Pomiary próbek elektrolitu po elektrolizie. Proces fotoelektrolizy wody morskiej przeprowadzono w szczelnie zamkniętej celi dwukomorowej wykonanej z kwarcu (Rys.4). Przedział anodowy oraz katodowy były przedzielone membraną z Nafionu. Każdy z przedziałów miał pojemność 450 ml. Fotoanoda była oświetlana za pomocą symulatora słonecznego Oriol 150 W z filtrem słonecznym, światłem o mocy 100–110 mW cm⁻². Jako elektrodę odniesienia wykorzystywano elektrodę chlorosrebrową (Ag/AgCl, E = +0,2 V vs SHE), jako elektrodę pomocniczą wykorzystano drut platynowy. Elektrolitem był roztwór NaCl o stężeniu 0,5 M (stężenie bliskie średniemu zasoleniu wody morskiej) zakwaszony do pH = 2 za pomocą kwasu solnego.

W trakcie fotoelektrolizy do układu było przyłożone stałe napięcie równe 0,6 V lub 0,75 V (vs. Ag/Ag/Cl), proces był prowadzony przez 15 minut, elektrolit był mieszany w trakcie całego procesu. Po zakończeniu elektrolizy roztwór był mieszany przez kolejne 5–10 minut w celu dyfuzji chloru z porów elektrody do elektrolitu. Następnie pobierano 5 ml roztworu z celi i wprowadzano do 100 ml roztworu DPD (lub oranżu metylowego) i mierzono natychmiast jego absorbancję. W przypadku oranżu metylowego mierzono absorbancję każdego roztworu przed i po wprowadzeniu chloru, aby określić jej różnicę. Na podstawie pomiarów absorbancji obliczono stężenie chloru w badanych próbkach, a znając dokładną objętość przedziału anodowego, obliczono liczbę moli powstałego chloru. Maksymalną teoretyczną ilość chloru, który mógł powstać w wyniku elektrolizy obliczono z pierwszego prawa elektrolizy Faradaya na podstawie wartości ładunku elektrycznego, jaki przepłynął przez układ.

$$n = \frac{Q}{Fz}$$

Gdzie: n to liczba moli chloru, Q to ładunek, który przepłynął w układzie, F to stała Faradaya, z to liczba elektronów wymienianych w reakcji redoks (w tym przypadku z = 2)

Ze stosunku powyższych wartości obliczono wydajność procentową wydzielania chloru na fotoanodach WO₃ oraz anodach z innych materiałów.

3. Wyniki

Poniższa tabela zawiera obliczone wartości wydajności wydzielania chloru dla różnych materiałów anod i fotoanod (Pt bez oświetlenia).

Tab. 2. Wydajności wydzielania chloru na anodach z różnych materiałów.

Material anody	Przyłożone napięcie [V vs Ag/AgCl]	Wydajność (metoda DPD)	Wydajność (metoda z oranżem metylowym)	Średnia wydajność [%]
WO ₃	0,60	73%	-	70 ± 10
WO ₃	0,60	72%	68%	
WO ₃	0,60	72%	66%	
WO ₃	0,60	74%	80%	
WO ₃	0,60	78%	83%	
WO ₃	0,75	65%	-	70 ± 10
WO ₃	0,75	79%	-	
FTO	1,50	20%	-	20
FTO	1,75	47%	-	47
Pt	1,50	64%	-	64
TiO ₂	0,60	40%	-	40
TiO ₂	1,00	49%	-	49

4. Dyskusja i wnioski

Obie metody analityczne (z wykorzystaniem DPD i oranżu metylowego jako indykatorów) dały zbliżone i powtarzalne wyniki. Ze względu na dużą czułość są to zdecydowanie lepsze, szybsze

i wygodniejsze metody do wykrywania małych ilości chloru niż np. metoda wykorzystująca miareczkowanie jodu powstałego w wyniku reakcji chloru z jodkiem potasu.

Wyraźnie widać, że głównym produktem utleniania na fotoanodach z tlenku wolframu(VI) jest chlor, pozostałe 30% stanowi tlen, mimo iż przyłożone do elektrod potencjały są niższe niż termodynamiczny potencjał utleniania anionów chlorkowych, co sugeruje katalityczne właściwości WO_3 . Wydajność wydzielania chloru na tlenku wolframu(VI) jest zdecydowanie większa niż w innych badanych materiałach, nawet przy przyłożonym wyższym napięciu. Powstający chlor, obok wodoru (surowca energetycznego) jest również cennym produktem reakcji, pierwiastkowy chlor jest bowiem substancją ważną w wielu gałęziach przemysłu, od uzdatniania i dezynfekcji wody do syntezy wielu związków organicznych.

Opisane w tej pracy wyniki zostały opublikowane w literaturze wraz z obszerniejszą charakterystyką fotoelektrochemiczną WO_3 (Jadwiszczak i in, 2019).

5. Literatura:

- Connick RE, Chia YT (1959) The Hydrolysis of Chlorine and Its Variation with Temperature. *Journal of American Chemical Society*, 81, 1280–1284.
- Fujishima A, Honda K (1972) Electrochemical Photolysis of Water at a Semiconductor Electrode. *Nature* 238, 37–38.
- Harris DC. (2009) *Exploring Chemical Analysis* (Fourth ed.), 538.
- Jadwiszczak M, Jakubow-Piotrowska K, Kedzierzawski P et al. (2019) Highly Efficient Sunlight-Driven Seawater Splitting in a Photoelectrochemical Cell with Chlorine Evolved at Nanostructured WO_3 Photoanode and Hydrogen Stored as Hydride within Metallic Cathode. *Advanced Energy Materials*, 1903213.
- Luo W, Yang Z, Li Z et al. (2011) Solar hydrogen generation from seawater with a modified BiVO_4 photoanode. *Energy & Environmental Science* 4, 4046–4051.
- Pourbaix M (1963) *Atlas d'équilibres électrochimiques*, Gauthier-Villars Editeur.
- Santato C, Odziemkowski M, Ulmann M et al. (2001) Crystallographically Oriented Mesoporous WO_3 Films: Synthesis, Characterization, and Applications. *Journal of American Chemical Society*, 123, 10639–10649.
- Solarska R, Jurczakowski R, Augustynski J (2012) A highly stable, efficient visible-light driven water photoelectrolysis system using a nanocrystalline WO_3 photoanode and a methane sulfonic acid electrolyte. *Nanoscale*, 4, 1553–1556.
- Whitney RP, Vivian JE (1941) Solubility of Chlorine in Water. *Industrial & Engineering Chemistry* 741–744.

4. Molekularne mechanizmy fototoksyczności leków

Molecular mechanisms of drugs phototoxicity

Lejwoda Karolina, Gumieniczek Anna

Katedra i Zakład Chemii Leków, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Opiekun naukowy: prof. dr hab. Anna Gumieniczek

Lejwoda Karolina: k.lejwoda94@gmail.com

Słowa Kluczowe: fotoreaktywność, fotogenotoksyczność, NLPZ, fluorochinolony

Streszczenie

Reakcje fotowrażliwości na substancje lecznicze można podzielić na fotoalergiczne i fototoksyczne. Różnią się one od siebie patogenezą, a także objawami klinicznymi i histologicznymi. Do leków o znacznych właściwościach fototoksycznych zaliczamy m.in. niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ) i fluorochinolony. Mechanizmy ich fototoksyczności obejmują tworzenie reaktywnych form tlenu, zarówno wolnych rodników (rodniki hydroksylowe, anionorodniki ponadtlenkowe, rodniki wodoronadtlenkowe), jak i niebędących wolnymi rodnikami (tlen singletowy). Reaktywne formy tlenu powodują uszkodzenia białek, lipidów i informacji genetycznej zawartej w DNA.

1. Wstęp

Fotowrażliwość jest niepożądaną reakcją pacjenta na lek podawany miejscowo lub ogólnoustrojowo na skutek działania promieniowania słonecznego. Istotne dla tego zjawiska promieniowanie obejmuje zakres UVB (280 - 315 nm), UVA (315 - 380 nm), oraz światło widzialne (380 – 750 nm). Reakcje fotowrażliwości możemy podzielić na fototoksyczne i fotoalergiczne, różniące się od siebie patogenezą, a także objawami klinicznymi i histologicznymi. Działanie fotoalergizujące to nadwrażliwość na promieniowanie UV spowodowana zmianami na poziomie chemicznym cząsteczki leku. Prowadzi ona do wytworzenia przeciwciał skierowanych przeciwko produktowi tej przemiany i objawia się także w nienaświetlanych partiach ciała. Fototoksyczność to reakcja polegająca na absorpcji promieniowania UV przez cząsteczkę leku, a następnie uwolnieniu zmagazynowanej w ten sposób energii w sposób prowadzący do niekorzystnych zmian w naświetlanych komórkach. Wśród leków o znacznych właściwościach fototoksycznych wyróżnić możemy m.in.: niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ) oraz fluorochinolony (Zuba et al. 2016).

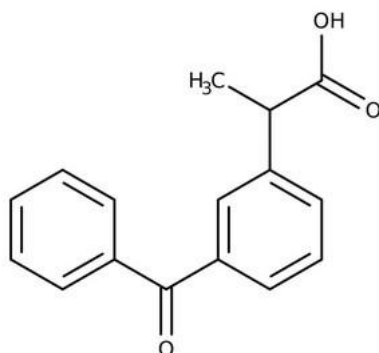
2. Opis zagadnienia

Zdolność leków do wywoływania fototoksyczności zależy od czynników fizycznych, chemicznych, farmakokinetycznych i farmakodynamicznych. Najważniejszym czynnikiem jest zdolność substancji leczniczej do absorpcji promieniowania w zakresie długości fal 280-750 nm. Ryzyko wzrasta dla leków charakteryzujących się wysoką wartością molowego współczynnika absorpcji (MEC), który można zdefiniować jako zdolność do absorpcji promieniowania o danej długości fali. Kolejną ważną cechą predysponującą do wywoływania fototoksyczności jest obecność atomów fluorowca w pierścieniu aromatycznym. Zerwanie wiązania między halogenem i pierścieniem aromatycznym pod wpływem promieniowania UV prowadzi do powstawania wolnych rodników, które przyczyniają się do bezpośredniego uszkodzenia komórek (Verdel et al. 2009).

Kiedy cząsteczka substancji leczniczej absorbuje promieniowanie świetlne, elektrony mogą być przenoszone z zajętych orbitali na niezajęte, a w zależności od typu wiązania i związanego z tym poziomu energii. Aby wrócić do stanu podstawowego, zaabsorbowana energia może być rozproszona w procesie bezpromienistym (przez wewnętrzną konwersję, relaksację wibracyjną lub przejście międzysystemowe), bądź też w procesie promienistym: luorescencją (singlet), fosforescencją (tryplet). Może również nastąpić reakcja chemiczna, której fotoprodukty lub półprodukty wykazują potencjalną reaktywność z makromolekułami komórki.

Tlen cząsteczkowy (rodnik trypletowy) w swoim stanie podstawowym jest dominującym akceptorem wbudzonej energii. Na skutek przekazania energii ze stanu wzbudzonego (reakcja fotochemiczna typu II) może powstać wzbudzony tlen singletowy, który uczestniczy w oksydacji lipidów błony komórkowej i białek, bądź też indukuje uszkodzenia DNA. Transfer elektronu lub protonu może prowadzić do powstawania wolnych rodników (reakcja fotochemiczna typu I), które bezpośrednio lub w obecności tlenu reagują z innymi cząsteczkami, tworząc kolejne wolne rodniki, tj. anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\bullet-}$) lub bardzo reaktywny rodnik hydroksylowy (OH^{\bullet}), znany produkt pośredni w oksydacyjnym uszkodzeniu DNA. Te pośrednie lub bezpośrednie reakcje mogą prowadzić do fototoksyczności poprzez oksydację komórkowych lipidów i białek, fotogenotoksyczności przez uszkodzenia DNA i fotoalergii przez tworzenie fotoantygenów (Satomi et al. 2016).

3. Przegląd literatury



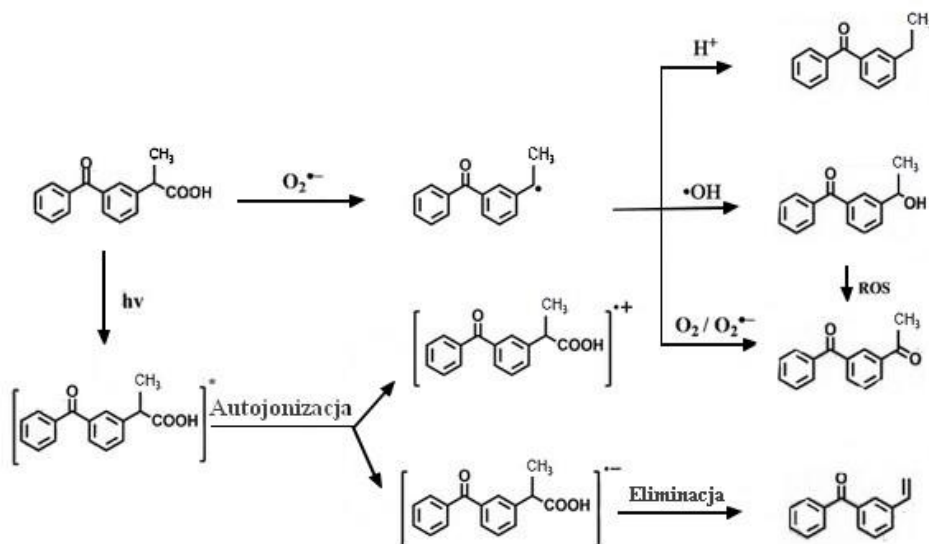
Rys. 1. Wzór strukturalny ketoprofenu.

Jednym z najlepiej poznanych leków o właściwościach fotoalergizujących jest ketoprofen (kwas 2-(3-benzoilofenilo) propanowy, Rys. 1) należący do grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ). Działa on przeciwzapalnie, przeciwbólowo i przeciwgorączkowo. Mechanizm działania polega na hamowaniu enzymów cyklooksygenazy 1 (COX-1) i cyklooksygenazy 2 (COX-2), czego efektem jest zahamowanie produkcji prostaglandyn. Do głównych działań niepożądanych ketoprofenu po podaniu doustnym zalicza się gastrotoksyczność i nefrotoksyczność. Miejscowe podanie leku na skórę w postaci żeli i aerozoli pozwala zminimalizować jego działanie toksyczne, co jest wykorzystywane głównie w objawowym leczeniu zmian zapalnych i zwyrodnieniowych mięśni i stawów.

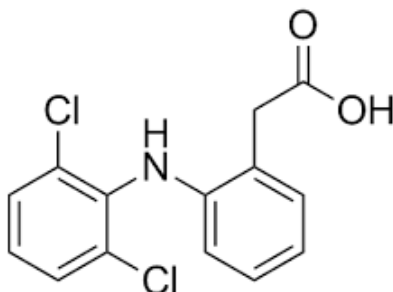
Udowodniono, że pod wpływem promieniowania UV ketoprofen ulega fotodegradacji z wytworzeniem reaktywnych form tlenu (ROS), między innymi poprzez reakcje dekarboksylacji. W wyniku reakcji fotochemicznej typu II powstaje tlen singletowy wywołujący peroksydację lipidów i fotodegradację deoksyguanozyny. Do innych efektów związanych z fotogenotoksycznością można zaliczyć wpływ tlenu singletowego na cykl komórkowy poprzez zatrzymanie fazy G2. Następuje zaburzenie syntezy białek wrzeciona podziałowego, głównie tubuliny, a także składników błony komórkowej potrzebnych do jej wytworzenia po zakończonym podziale. Produkty fotorozkładu ketoprofenu przyczyniają się również do uszkodzenia mitochondriów i lizosomów w keratynocytach (Ray et al. 2013).

Innym lekiem należącym do grupy NLPZ, którego działanie fototoksyczne zostało dobrze poznane jest diklofenak (kwas 2-(2,6-dichlorofenilo) aminofenylloctowy, Rys 3). Podobnie jak ketoprofen, jest wykorzystywany w leczeniu bólu i schorzeń reumatycznych. Może być podawany zarówno miejscowo w postaci żeli i plastrów naklejanych na skórę, jak i doustnie oraz w postaci iniekcji. Do jego głównych działań niepożądanych należy gastrotoksyczność oraz uszkodzenie serca i nerek. U ludzi diklofenak ulega biotransformacji przy udziale transferazy glukuronowej oraz

pojedynczej lub wielokrotnej hydroksylacji i metoksylacji do kilku pochodnych fenolowych. Dwa spośród metabolitów fenolowych wykazują aktywność farmakologiczną, chociaż w znacznie mniejszym zakresie niż diklofenak. Są to 4'-hydroksy- i 5-hydroksy-diklofenak (4'-OH-DCF i 5OH-DCF).



Rys. 2. Schemat fotodegradacji ketoprofenu (na podstawie Wang et al. 2017); (ROS-reaktywne formy tlenu).



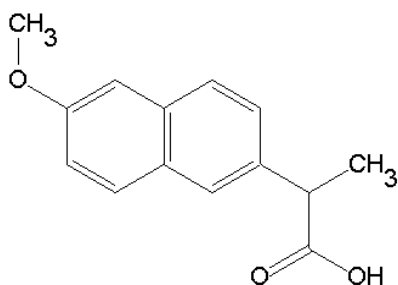
Rys. 3. Wzór strukturalny diklofenaku.

Wykazano, że metabolity te mogą być bardziej fotoreaktywne i działać bardziej fototoksycznie od samego diklofenaku. Hydroksylacja pierścieni aromatycznych w pozycjach 4' i 5 skutkuje powstaniem nowych grup chromoforowych, w wyniku czego zwiększa się zdolność do absorbowania promieniowania świetlnego i reaktywność fotochemiczna. Następuje rozerwanie wiązań między węglem i chlorem z wytworzeniem reaktywnego rodnika arylowego i anionu chlorkowego. Metabolity diklofenaku, głównie 5OH-DCF, wytwarzają więcej aktywnej pochodnej chlorokarbazolu oraz odznaczają się wyższą fotogenotoksycznością od diklofenaku. Powstający chlorokarbazol może powodować między innymi peroksydację lipidów i hemolizę erytrocytów (Garcia-Lainez et al. 2018).

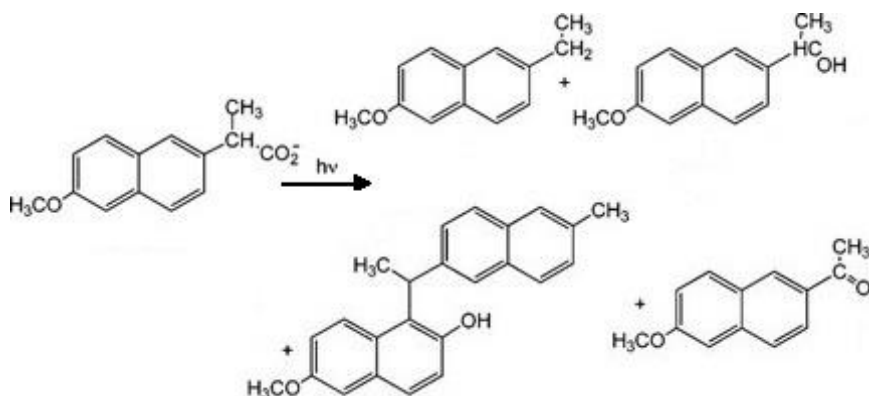
Naproksen (kwas 2-(6-metoksynaftalen-2-yl)propanowy)) (Rys.4) oprócz działania fotouczulającego powoduje także nasielenie hemolizy erytrocytów oraz pękanie nici DNA. W wyniku fotodegradacji powstaje tlen singletowy oraz rodniki ponadtlenkowe indukujące peroksydację

lipidów (Klefař et al. 2008). W porównaniu do ketoprofenu, naproksen nie wpływa znacząco na powstawanie cyklobutanowych dimerów pirymidyny w testach fotogenotoksyczności. Jednakże zaobserwowano zwiększone powstawanie tych dimerów w wyniku dłuższego działania promieniowania UVA, co może być powodowane zwiększoną fotoreaktywnością powstających metabolitów naproksenu (Bracchitta et al. 2013).

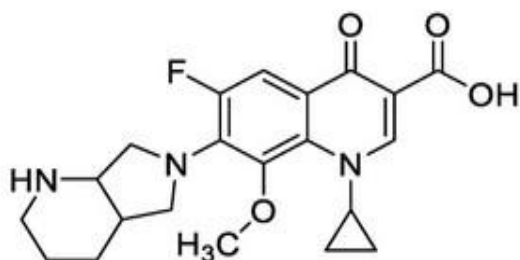
Inną grupą leków o potwierdzonym działaniu fotouczulającym są fluorochinolony. Należą do chemioterapeutyków o szerokim spektrum działania przeciwbakteryjnego. Wykazują aktywność zarówno na bakterie Gram-dodatnie, jak i Gram-ujemne. Mechanizm działania polega na hamowaniu gyrazy DNA (topoizomareazy II) i topoizomareazy IV, enzymów biorących udział w procesie replikacji, transkrypcji i rekombinacji bakteryjnego DNA. Najpowszechniej stosowanymi lekami z tej grupy są: cyprofloksacyna, lewofloksacyna, moksyfloksacyna (Rys. 6), norfloksacyna (Rys. 7), ofloksacyna. Jednym z głównych działań niepożądanych fluorochinolonów jest wysypka, rumień, a także zespół Stevensa-Johnsona oraz toksyczna nekroliza naskórka (Kuula et al. 2019).



Rys. 4. Wzór strukturalny naproksenu.



Rys. 5. Reakcja fotodegradacji naproksenu (na podstawie Khetan et al. 2007).

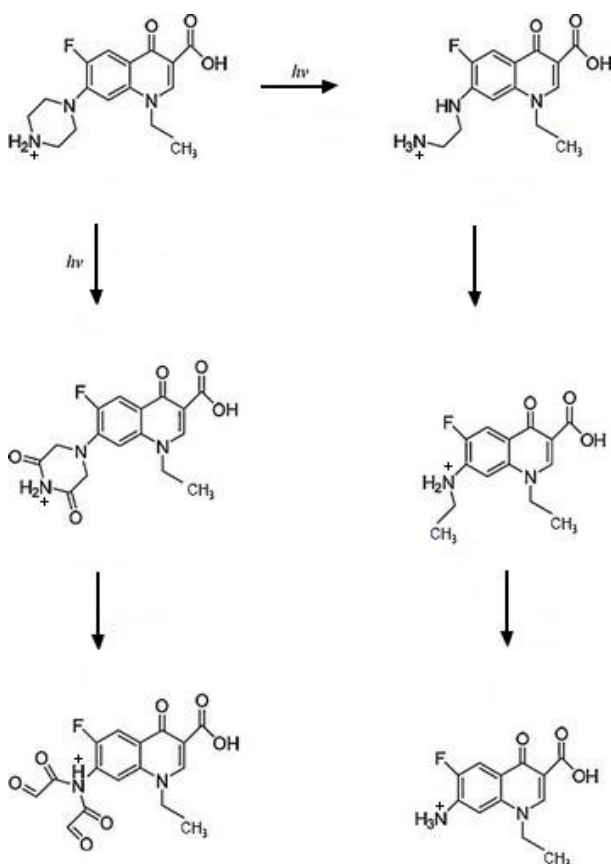


Rys. 6. Wzór strukturalny moksyflokscyny.



Rys. 7. Wzór strukturalny norflokscyny.

Pod wpływem światła fluorochinolony ulegają szeregowi reakcji fotochemicznych, takich jak dehalogenacja, utlenianie grupy aminowej w pozycji C-7, dekarboksylacja. Powstają również rodniki hydroksylowe, anionorodniki ponadtlenkowe, rodniki wodoronadtlenkowe i tlen singletowy. Reaktywne formy tlenu powodują uszkodzenia białek, lipidów i informacji genetycznej zawartej w DNA (Beberok et al. 2015).



Rys. 8. Schemat fotodegradacji norflokscyny (na podstawie Ahmad et al. 2015).

Moksyflokscyna, jedna z najnowszych pochodnych, posiada grupę metoksyłową w pozycji C-8, co znacznie poprawia jej fotostabilność i zmniejsza fototoksyczny potencjał leku. Jednak w literaturze istnieją doniesienia o toksycznym wpływie moksyflokscyny na ludzkie melanocyty.

Lek ten hamuje proces melanogenzy oraz może tworzyć kompleksy z melaniną, co prowadzi do ich gromadzenia się w komórkach zawierających dużo melaniny (Beberok et al. 2015).

4. Podsumowanie

Niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ) oraz fluorochinolony należą do leków o najlepiej poznanym mechanizmie fototoksycznym. Wykazano, że na fotoreaktywność leku wpływa głównie jego zdolność do absorpcji promieniowania w zakresie UVB, UVA i światła widzialnego oraz obecność atomów fluorowca w cząsteczce. Właściwości fototoksyczne lek może wykazywać bezpośrednio lub przez swoje fotoreaktywne metabolity. Mechanizm obejmuje tworzenie wolnych form tlenu będących rodnikami (rodniki hydroksylowe, anionorodniki ponadtlenkowe, rodniki wodoronadtlenkowe) i niebędących rodnikami (tlen singletowy). Reaktywne formy tlenu powodują uszkodzenia białek, lipidów i informacji genetycznej zawartej w DNA. Znajomość molekularnych mechanizmów fototoksyczności umożliwia projektowanie nowych pochodnych wykazujących większą fotostabilność, a co za tym idzie - większe bezpieczeństwo stosowania.

5. Literatura

Ahmed I, Bano R, Musharraf SG et al. (2015) Photodegradation of norfloxacin in aqueous and organic solvents: A kinetic study: *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 302(1): 1-10

Beberok A, Wrześniok D, Otręba M et al. (2015) Effect of norfloxacin and moxifloxacin on melanin synthesis and antioxidant enzymes activity in normal human melanocytes: *Molecular and Cellular Biochemistry* 401: 107-114

Bracchitta G, Catalfo A, Martineau S et al. (2013) Investigation of the phototoxicity and cytotoxicity of naproxen, a non-steroidal anti-inflammatory drug, in human fibroblasts: *Photochemical & Photobiological Sciences* 12: 911-922

Garcia-Lainez G, Martinez-Reig AM, Limones-Herrero D et al. (2018) Photo(geno)toxicity changes associated with hydroxylation of the aromatic chromophores during diclofenac metabolism: *Toxicology and Applied Pharmacology* 15:341: 51-55

Khetan SK, Collins T (2007) Human Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: A Challenge to Green Chemistry: *Chemical Reviews* 107(6): 2319-2364

Klefah A, Musa K, Eriksson LA (2008) Theoretical Study of the Phototoxicity of Naproxen and the Active Form of Nabumetone: *The Journal of Physical Chemistry* 112: 10921–10930

Kuula L, Vilijemaa K, Backman T et al. (2019) Fluoroquinolone-related adverse events resulting in health service use and costs: A systematic review: *Public Library of Science* 14(4): e0216029

Ray RS, Mujtaba SF, Dwivedi A et al. (2013) Singlet oxygen mediated DNA damage induced phototoxicity by Ketoprofen resulting in mitochondrial depolarization and lysosomal destabilization: *Toxicology* 314(2-3): 229-237

Satomi O, Yoshiki S, Hideyuki S et al. (2016) Chemical photoallergy: photobiochemical mechanisms, classification, and risk assessments: *Journal of Dermatological Science* 85(1): 4-11

Verdel BM, Souverein PC, Meyboom RHB et al. (2009) Risk of drug-induced photosensitivity: focus on spectroscopic and molecular characteristics: *Pharmacoepidemiology and Drug Safety* 18: 602-609

Wang Y, Deng W, Wang F et al. (2017) Study of the simulated sunlight photolysis mechanism of ketoprofen: the role of superoxide anion radicals, transformation byproducts, and ecotoxicity assessment: *Environmental Science Processes & Impacts* 19: 1176-1184

Zuba EB, Koronowska S, Osmola-Mańkowska A et al. (2016) Drug-induced Photosensitivity: *Acta Dermatovenerologica Croatica* 24(1): 55-64

5. Chropowatość powierzchni biomateriału jako jeden z czynników warunkujących odpowiedź biologiczną komórki.

Surface roughness of the biomaterial as one of the factors determining the biological response of the cell

Agata Ładniak

Katedra Zjawisk Międzyfazowych, Instytut Nauk Chemicznych, Wydział Chemii UMCS w Lublinie

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

Kowalski Adam: agata.gozdecka@umcs.pl

Słowa Kluczowe: topografia, implanty, komórki

Streszczenie

Substancje stosowane jako implanty, obok odpowiednich cech chemicznych (zwilżalność, skład, energia powierzchniowa), powinny wykazywać także odpowiednie właściwości fizyczne, które określane są za pomocą takich parametrów powierzchniowych, jak: topografia czy chropowatość. Nie tylko odpowiednie oddziaływania/wiązania implant-komórka warunkują użyteczność materiałów w wymienionej dziedzinie życia. Charakter tych oddziaływań jest ważny, ale samodzielnie niewystarczający. Dopiero towarzyszące im odpowiednie właściwości warstwy wierzchniej implantu, stwarzają obiecujące warunki dla przyczepu i rozwoju tkanek. Niemożliwym jest jednak stworzenie implantu uniwersalnego, bowiem organy różnią się między sobą, między innymi wielkością, elastycznością, wytrzymałością czy też teksturą. Dlatego podczas wytwarzania materiałów mających potencjalne zastosowanie jako zamienniki konkretnego organu czy tkanki, ważne jest aby posiadały one cechy jak najbardziej zbliżone do użycia docelowego. Poniższy przegląd literatury miał na celu przedstawienie wpływu chropowatości powierzchni na procesy związane z namnażaniem tkanek różnego rodzaju. Rozbieżności uzyskiwanych wyników w zależności od typu substancji użytych do wytworzenia ostatecznego „produktu”, sugerują konieczność wykonywania badań *iv vivo* oraz *in vitro*, gdyż niewielkie różnice w proporcjach komponentów czy metodzie wytwarzania, mogą finalnie drastycznie zmienić ich właściwości. Poszukiwanie i produkcja nowych implantów jest „procesem” interdyscyplinarnym, wymagającym dużej wiedzy z zakresu biologii, chemii, fizyki i technologii.

1. Wstęp

Słowo implant pochodzi z języka łacińskiego (*im plantare*), które w dosłownym tłumaczeniu brzmi „wsadzić”. Definiowany jest jako wszczep, czyli ciało obce wszczepiane do organizmu, którego głównym celem jest odtworzenie naturalnej funkcji narządu i/lub poprawa estetyki uszkodzonego organu. Bardzo szeroko stosowane są między innymi implanty kości, czy też silikonowe implanty piersi. Natomiast w ortopedii bardzo częste są operacje wszczepienia endoprotezy stawu biodrowego czy kolanowego.

Endoprotezy stanowią elementy zastępujące lub wspomagające utraconą funkcję narządu lub narządów. Są one wytwarzane głównie z biomateriałów, których główną cechą jest kompatybilność z organizmami żywymi co oznacza, że muszą pasować do właściwości mechanicznych zastępowanej tkanki i nie mogą działać cytotoksycznie, mutagennie ani immunogennie (Parizek i in. 2013). Jednakże, stanowią one tylko niewielki ułamek z wielu cech, jakimi muszą charakteryzować się materiały mające potencjalny kontakt z tkankami.

Substancje wykorzystywane jako implanty powinny posiadać takie właściwości, jak: biodegradowalność, brak cytotoksyczności oraz wywoływania odczynów zapalnych i alergicznych. Dopiero wówczas można je zaliczyć do grupy biomateriałów biokompatybilnych. Materiały biodegradowalne zostały zaprojektowane tak, aby ostatecznie mogły być zastąpione tkanką autologiczną. W idealnym przypadku, po resorbowaniu materiału, nie powinien istnieć żaden ślad implantu. Zatem gama substratów stosowanych jako implanty jest ograniczona do układów, które

mogą być łatwo metabolizowane przez organizm. Szybkości rozpuszczania się można dostosować do potrzeb konkretnej komórki lub tkanki. Komórki, które szybko się namnażają – wymagają rusztowań o wyższych wskaźnikach degradacji, natomiast struktury tkanek potrzebują stabilności i siły, a więc materiału z dłuższym czasem degradacji (Chang i Wang 2011).

Ponadto polimery biodegradowalne mogą zapewniać dodatkowy poziom kontroli odpowiedzi komórek. Dzieje się dlatego, że podczas degradacji powierzchnia polimeru jest stale odnawiana, zapewniając dynamiczne podłoże do przylączenia się i wzrostu komórek. W tej sytuacji komórki nie żyją w statycznym otoczeniu, lecz istnieją w sprzyjającym, dynamicznie rozwijającym się środowisku. Podczas adhezji i migracji komórki dostosowują się i komunikują z otoczeniem wieloma metodami, od różnicowania, ekspresji genów, po wzrost i apoptozę.

Oprócz wyżej wymienionych atutów, ważne są także parametry fizykochemiczne powierzchni. Bowiern mają one istotny wpływ na zachowanie się komórek w różnych stadiach rozwojowych, oraz podczas procesów zachodzących podczas jej naprawy i/lub namnażania. Bardzo istotne są czynniki związane przede wszystkim z powierzchnią wszczepu, ponieważ to ona ma bezpośredni kontakt z układem biologicznym. Procesy jakie mają miejsce w warstwie wierzchniej biomateriału są ściśle uzależnione od jej właściwości charakteryzowanych między innymi przez: skład powierzchniowy, charakter hydrofilowo-hydrofobowy, zwilżalność, energię powierzchniową, czy topografię.

Kluczowym elementem jest powierzchnia implantu, która decyduje o jego ostatecznej zdolności do integracji z otaczającą tkanką. Jednakże złożony wpływ energii powierzchniowej, składu, ładunku powierzchniowego, chropowatości i topografii odgrywa ważną rolę podczas początkowych faz odpowiedzi biologicznej na implant, takich jak adsorpcja białka i przyleganie komórkowe, a także podczas faz późniejszych i bardziej przewlekłych stanów. Już skład samego materiału może generować nam różnorodną przyczepność komórkową. Przykładowo inkubacja mikroorganizmów *Staphylococcus epidermidis* (Gabriel i in. 1994), (powszechnie związanych z infekcjami skoncentrowanymi np. na narzędziach chirurgicznych) w obecności substratów tytanowych (Ti), glinowych (Al) i wanadowych (V) przez 15–60 minut wykazała, że te organizmy przylegały preferencyjnie do powierzchni V. Liczba przylegających mikroorganizmów na jednostkę powierzchni V wynosiła odpowiednio około dwa i trzy razy więcej niż ta występująca na Ti i Al. Z drugiej strony potwierdzono, że nawet w przypadku tego samego typu powierzchni (chemicznie równoważne, różniące się jedynie strukturalnie) mogą wystąpić dramatyczne różnice w zdolności komórek do przylegania do powierzchni. Przykładowo, takie zjawisko odnotowano dla komórek nerki na dwóch różnych kryształach tetrahydratu winianu wapnia, mimo że dwie powierzchnie krystalograficzne chemicznie równoważne wykazywały znaczące różnice w odniesieniu do zjawiska adhezji komórkowej (Hanein i in 1993; 1994).

Wykazano również, że odpowiedź komórkowa na właściwości warstwy wierzchniej implantu zmienia się w zależności od typu komórki. Na odpowiedzi proliferacyjne fibroblastów i komórek nabłonkowych znaczny wpływ w przypadku tytanu mają cechy jego powierzchni (Cochran i in. 1994). Badanie odpowiedzi chondrocytów strefy spoczynkowej i wzrostu na chropowatość powierzchni sugeruje, że obserwowane efekty mogą być również zależne od etapu dojrzewania komórek (Schwartz i in. 1996). W obu przypadkach ogólną tendencją był spadek liczby komórek i syntezy DNA wraz ze wzrostem chropowatości powierzchni. Jednakże, komórki strefy spoczynkowej wydawały się być bardziej wrażliwe na różnice w chropowatości powierzchni niż komórki strefy wzrostu.

Nie jest możliwe wytworzenie implantu uniwersalnego, który stwarzałby idealne warunki do naprawy i wzrostu wszystkich możliwych tkanek występujących w organizmach żywych. W zależności od miejsca przeznaczenia, czy właściwości fizyko-chemicznych organu, ważne jest także ich monitorowanie podczas procesu związanego z namnażaniem/wytwarzaniem nowych narządów, bowiem nie muszą być one takie same na każdym jego etapie. Dlatego wiedza o mechanizmach rządzących organizmem żywym w kontakcie z ciałem obcym oraz zrozumienie ich pod względem chemicznych i fizycznych, jest obiecującą drogą do znalezienia najbardziej odpowiedniego wszczepu.

2. Opis zagadnienia

Ten przegląd ma na celu omówienie wpływu właściwości powierzchni, głównie takich jak chropowatość, na odpowiedź komórkową względem materiału implantu. Badacze sugerują, że obok składu i topografii powierzchni również tzw. wypukłości oraz ich kształty odgrywają znaczącą rolę w „przyczepianiu się” i dojrzeniu komórek wzdłuż odpowiednich ścieżek różnicowania. Różnorodna tekstura powierzchni powoduje różne formy kontaktu między komórkami a otaczającą matrycą. To z kolei wpływa na interakcje komórkowe na powierzchni i powoduje różnice w rodzajach połączeń, które mogą wystąpić na styku. Aby zoptymalizować możliwość procesów naprawczych/twórczych tkanek, należy zrozumieć nie tylko, w jaki sposób właściwości powierzchni implantu (charakteryzowane przez: energię powierzchniową, skład, chropowatość i topografię) wpływają na początkową odpowiedź biologiczną, ale także w jaki sposób te cechy mogą sterować długoterminową odpowiedzią biologiczną, tj. procesem proliferacji komórek, różnicowania, wytwarzania macierzy itp.

Oczekuje się, że zrozumienie, w jaki sposób właściwości materiału wpływają na bezpośrednią odpowiedź komórkową doprowadzą do opracowania powierzchni i materiałów, które ułatwią pomyślne włączenie ich do otaczającej tkanki.

3. Przegląd literatury

a. Profilometr optyczny – przyrząd do analizowania chropowatości powierzchni

W zależności od skali nieregularności powierzchni materiału, chropowatość powierzchni można podzielić na makroporowatość (100 μm - milimetry), mikroporowatość (100 nm - 100 μm) i nanoporowatość (mniej niż 100 nm) (Chang i Wang 2011). Chropowatość powierzchni odnosi się do tekstury najwyższej warstwy materiału i jest mierzona ilościowo przez pomiar występów lub zagłębień na powierzchni (Ross i in. 2012). Jest ona reprezentowana przez różne parametry, w tym R_a (średnia arytmetyczna wysokość), R_q (średni kwadrat wartości wysokości) i R_z (różnica wysokości między średnią z pięciu: najwyższych szczytów i najniższych dolin) (Cheng i in. 2019), które ilościowo obrazują stopień chropowatości dla danej powierzchni, a zatem są szeroko stosowane do opisywania powierzchni matryc do hodowli komórek *in vitro*.

Jednakże podczas analizy parametrów uzyskiwanych w wyniku skanowania określonej powierzchni badanego materiału, należy wziąć pod uwagę, że ich wartości mogą znacznie się różnić w zależności od zastosowanego powiększenia, tzn. od powierzchni obszaru poddawanego skanowaniu w danym momencie.

b. Osteoblasty wrażliwe na różnice w chropowatości powierzchni implantów

Hipotezę dotyczącą wpływu chropowatości powierzchni na zachowanie się na niej komórek organizmów żywych, potwierdzają badania z wykorzystaniem komórek podobnych do osteoblastów z eksplantatów szczurów (Bowers i in. 1992). Komórki te hodowane na materiałach tytanowych o R_a w zakresie od 0,14 μm do 1,15 μm okazały się być wrażliwe na różnice w szorstkości. Zauważono, że piaskowana powierzchnia o pośredniej szorstkości ($R_a=0,87 \mu\text{m}$) miała wyższy poziom przyczepienia komórek niż kontrolne tworzywa sztuczne i inne powierzchnie tytanowe. Ponadto wystąpiły także różnice na poziomie morfologii komórki w zależności od typu powierzchni na jakiej były hodowane. Pozwoliło to na wysunięcie wniosku, że chropowatość powierzchni komercyjnie czystego tytanu ma wpływ na początkowe przyłączenie komórek i późniejsze rozprzestrzenianie się oraz moduluje proliferację i różnicowanie komórek, syntezę matrycy i lokalne wytwarzanie czynników (Kieswetter i in. 1996). Takie same wnioski zostały wyciągnięte przez Yamashita i in. 2009, którzy również badali wpływ chropowatości powierzchni na początkowe przyłączenie mysich komórek podobnych do osteoblastów MC3T3-E1. Badano nanokompozyt cyrkon/tlenek glinu i tlenek cyrkonu stabilizowany tlenkiem itru w porównaniu do czystego tytanu i tlenku glinu (chropowatość powierzchni R_a dla układów gładkich wynosiła średnio 0,24 μm , a dla szorstkich $\sim 1,04 \mu\text{m}$).

Badania te zostały potwierdzone przez (Hatano i in. 1999), gdzie również zanotowano, iż osteoblasty szczurów miały wyższą proliferację oraz podwyższoną aktywność fosfatazy alkalicznej

(ALP) i ekspresję osteokalcyny na szorstkiej powierzchni (0,81 μm) w porównaniu z powierzchnią gładką.

Co ciekawe, odwrotną zależność zanotowali (Washburn i in. 2004) podczas badania mysiej linii komórkowej podobnej do osteoblastów MC3T3-E1, bowiem okazało się, że szybkość proliferacji na gładkich obszarach (0,55 nm) badanej folii jest znacznie większa niż na obszarach szorstkich (13 nm).

Poddając wnikliwej analizie dane otrzymane przez poszczególnych badaczy, możliwe jest stwierdzenie ogólne, iż może istnieć kilka różnych (pod względem topograficznym) powierzchni danego materiału, które mimo swej różnorodności mogą być w każdym przypadku kompatybilne z organizmami żywymi, a adhezja oraz namnażanie się na ich powierzchni nowych komórek może być uwarunkowana nieco innymi mechanizmami (ale w każdym z przypadków – akceptowalnymi).

c. Namnażanie chondrocytów na implantach o różnej chropowatości

Podobnie, jak omówione w poprzednim rozdziale osteoblasty, również chondrocyty – czyli komórki tkanki chrzęstnej, są wrażliwe na teksturę implantu. Ich hodowla na gładkich powierzchniach skutkowałą spadkiem produkcji proteoglikanu i kolagenu w stosunku do próby kontrolnej z tworzyw sztucznych (Kieswettertal i in. 1996). Jednakże reakcje chondrocytów strefy spoczynkowej i wzrostu na chropowatość powierzchni były jednak wyraźnie różne. Produkcja kolagenu przez mniej dojrzałe chondrocyty strefy spoczynku była znacznie mniejsza niż w przypadku kontroli na gładkich powierzchniach. Natomiast, dla bardziej dojrzałych chondrocytów była równoważna z produkcją kontrolną z tworzywa sztucznego, ale z kolei znacznie mniejsza na bardziej szorstkich powierzchniach. Początkowo nieznaczny wzrost chropowatości powierzchni powodował opóźnienie zdolności komórek do rozwoju w bardziej dojrzałe fenotypy w stosunku do komórek hodowanych na plastiku, jednakże w pewnym momencie zaobserwowano odwrotny efekt wraz z dalszym wzrostem chropowatości powierzchni. Ogólnie komórki wyhodowane na tych bardziej chropowatych powierzchniach okazały się fenotypowo bardziej dojrzałe oraz stwierdzono zwiększoną proliferację i zmniejszoną syntezę kolagenu niż w przypadku komórek wyhodowanych na próbach kontrolnych wykonanych z tworzywa sztucznego.

Ponadto w innych badaniach, hodowla na szorstkich plazmowanych powierzchniach pozwoliła na uzyskanie komórek zaokrąglonych, charakteryzujących się wypustkami cytoplazmatycznymi. Natomiast komórki hodowane na gładkich powierzchniach uzyskanych w wyniku elektropolierowania miały dobrze rozłożoną, spłaszczoną morfologię (analogiczne uzyskano podczas hodowli na plastiku) (Schwartz i in. 1996).

d. Rozprzestrzenianie się naczyniowych komórek mięśni gładkich (VSMC) na chropowatych implantach

Badacze Parizek i in. 2013, podjęli się analizy zachowania komórek mięśni gładkich na powierzchniach o różnych stopniach chropowatości. W tym celu przygotowali oni dwa podłoża: polietylen o niskiej (LDPE) i wysokiej (HDPE) gęstości. W celu uzyskania powierzchni charakteryzujących się odmienną teksturą, polimery te dodatkowo zostały poddane modyfikacji za pomocą plazmy argonowej. A następnie szczepiono je: glicyną (Gly), glikolem polietylenowym (PEG), albuminą surowicy bydłowej (BSA), cząstkami węgla koloidalnego (C) lub mieszaniną BSA + C. Po przeprowadzeniu badań największe różnice w chropowatości uzyskano po szczepieniu glicyną i PEG.

W przypadku próbki modyfikowanej za pomocą PEG, początkowo przyczepiła się stosunkowo niska liczba komórek VSMC, ale obszar rozprzestrzeniania się komórek w pierwszym dniu po posianiu na tym materiale ($1527 \pm 98 \mu\text{m}^2$) był średnio większy niż obszary na innych zmodyfikowanych próbkach LDPE, a ponadto znacznie większy niż obszary na niemodyfikowanym LDPE. Z drugiej strony obszary rozprzestrzeniania się komórek VSMC na modyfikowanym HDPE były większe niż te na niemodyfikowanej powierzchni polimeru. Co zostało wytłumaczone jako wynik wzrostu stężenia tlenu na powierzchni próbek zmodyfikowanego polimeru, ich zoptymalizowaną zwilżalnością, a także zmianami chropowatości powierzchni i morfologii.

Natomiast modyfikacja przy zastosowaniu BSA spowodowała wystąpienie struktur klastrowych rzędu nanometrów (dokładniej < niż 100 nm) i submikronowych (tj. mniejszych niż 1 μm), które sprzyjają adsorpcji cząsteczek pośredniczących w adhezji komórek w bardziej fizjologicznej konformacji niż konwencjonalne powierzchnie płaskie, co z kolei znacznie wpływa na poprawę adhezji i dalsze funkcjonowanie komórek.

e. Hodowla komórek neuronów na biomateriałach

Badania przeprowadzone przez zespoły Bartolo oraz Chung mające na celu określenie zachowania neuronów oraz komórek śródbłonna żyły ludzkiej na powierzchniach z chropowatością w skali od nanoskali (6,26 nm) do mikroskopii (200 nm) (Bartolo i in. 2008; Chung i in. 2003), pozwoliły na stwierdzenie, że szorstkie błony w nanoskali wydają się bardziej wspierać wzrost neurytów, modulując proces rozwoju neuronów. Natomiast, w przypadku mniejszych komórek efekt był odwrotny – zwiększenie chropowatości powierzchni biomateriałów w skali nanometrycznej (10–102 nm) poprawia adhezję i wzrost tego typu komórek.

Z kolei Brunetti i in. 2010 wykonali badania oparte na analizie reakcji ludzkiej linii komórkowej nerwiaka niedojrzałego (SH-SY5Y) na powierzchni złota o różnych poziomach nanoporowatości wykazały, że komórki neuronowe SH-SY5Y mają zaskakująco wysoką wrażliwość na cechy nanoskali. Zauważono, że neurony wyczuwają i aktywnie reagują na nanotopografię powierzchniową, z zaskakującą wrażliwością na zmiany nawet rzędu kilku nanometrów. Specyficzna i funkcjonalna adhezja komórek występowała tylko na płaskich paskach złota, z wyraźnym samowyrównaniem neuronów. Na tej podstawie można wysnuć kolejny wniosek, że małe wartości nanoporowatości powierzchni są w stanie wygenerować ogromną odpowiedź biologiczną pod względem żywotności komórek.

f. Namnażanie komórek – a kontrola chropowatości podłoża

Grupa badawcza Deligianni in. 2012 podjęła się analizy przyłączania i proliferacji komórek ROS 17/2.8 na powierzchni hydroksyapatytu (HA) o kontrolowanej chropowatości powierzchni, tzn. wstępnie wypolerowane próbki HA zostały poddane nadzorowanym zadrapaniom za pomocą papieru metalograficznego SiC. W oparciu o pomiar chropowatości powierzchni, wyznaczono parametr R_a dla dwóch próbek: HA-P – dla której wynosi on $0,259 \pm 0,123$ mm, a dla HA-240 – $0,341 \pm 0,070$ mm. Po wnikliwej analizie danych naukowcy doszli do wniosku, iż różnica chropowatości powierzchni między tymi dwiema próbkami nie jest wystarczająco duża, aby wykazać statystycznie istotną różnicę w liczbie przyczepionych komórek; „zadrapania” generowane przy użyciu papieru prowadzą do większej liczby mostków komórkowych w rowkach a co za tym idzie – wyższej średniej liczby przyłączonych komórek i najwyższej maksymalnej liczby przyłączonych komórek. Podsumowując, wyższy stopień przyczepności i proliferacji komórek w przypadku szorstkiej powierzchni został podyktowany głównie zwiększoną dostępnością pożywki i białek surowicy dzięki obecności rowków z przyłączonymi komórkami.

Opisywane powyżej zależności nie wystąpiły w przypadku badań *in vitro* procesu przyłączania i proliferacji komórkowej fibroblastów na powierzchni materiałów tytanowych modyfikowanych za pomocą plazmowego utleniania elektrolitycznego, obróbki elektroerozyjnej, w wyniku czego otrzymano materiały różniące się szorstkością i porowatością. Wygenerowano trzy warianty powierzchni: z „gładką”, „średnio-grubą” i „szorstką” topografią. Analiza otrzymanych danych nie pozwoliła jednak na wysunięcie jakiegokolwiek jednoznacznej zależności pomiędzy poszczególnymi próbkami (między sobą oraz w odniesieniu do próby kontrolnej) (Jung i in. 2016).

Z kolei badania komórkowe z wykorzystaniem somatycznych komórek macierzystych wykazały lepszą adhezję, wzrost komórek i proliferację dla próbek polistyrenu modyfikowanych przez plazmę tlenową przy dłuższym czasie ekspozycji niż w przypadku polimerów nie poddawanych procesowi plazmowania (Biazar i in. 2011). Ponadto folie napromieniowane plazmą przez dłuższy czas wykazały lepszą żywotność. Ogólnie chropowatość powierzchni polistyrenu wzrastała wraz ze wzrostem czasu ekspozycji materiału na działanie promieniowania plazmowego. Próbki napromieniowane plazmą tlenową wykazywały większą szorstkość (31 nm) w porównaniu z próbkami napromieniowanymi plazmą obojętną (16 nm) po 180 sekundach.

4. Podsumowanie

Powszechnie wiadomo, że jedna z czterech cech fizykochemicznych (chropowatość, topografia, skład, zwilżalność) opisujących powierzchnię implantów może odgrywać bardziej dominującą rolę w procesach związanych z namnażaniem nowych komórek. Ważne jest, aby zdawać sobie sprawę, że wszystkie są ze sobą ściśle powiązane i że ich związek może dyktować przebieg mechanizmów zachodzących na granicy implant-komórka.

Ten przegląd miał na celu przedstawienie/udowodnienie, jak ważna jest chropowatość powierzchni biomateriałów stosowanych w implantologii w procesach związanych z naprawą lub namnażaniem tkanek w organizmach żywych, oraz określenie jej wpływu na poszczególne etapy wymienionych procesów. Starannie przemyślane i kontrolowane badania *in vitro* nad wpływem składu powierzchni, chropowatości, tekstury i/lub energii mogą zapewnić znaczny wgląd w zdolność powierzchni do modulowania odpowiedzi komórkowej i przybliżyć badaczy do otrzymania biomateriału o maksymalnej biokompatybilności.

5. Literatura

- Bartolo LD, Rende M, Morelli S i in. (2008) Influence of membrane surface properties on the growth of neuronal cells isolated from hippocampus. *J. Membr. Sci*, 325, 139-149.
- Biazar E, Heidari M, Asefzhad A i in. (2011) The relationship between cellular adhesion and surface roughness in polystyrene modified by microwave plasma radiation. *Int J Nanomedicine* 6: 631–639.
- Bowers K, Keller JC, Randolph B. i in. (1992) Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses *in vitro*. *Int J Oral Max Impl* 7:302-310.
- Brunetti V, Maiorano G, Rizzello L i in. (2010) Neurons sense nanoscale roughness with nanometer sensitivity. *Pro Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 107(14): 6264-9.
- Chang HI, Wang Y (2011) Cell Responses to Surface and Architecture of Tissue Engineering Scaffolds. *Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials*, DOI: 10.5772/21983
- Chung TW, Liu DZ, Wang SY i in. (2003). Enhancement of the growth of human endothelial cells by surface roughness at nanometer scale. *Biomater* 24: 4655-4661.
- Cheng Y, Feng G, Moraru CI (2019) Micro- and Nanotopography Sensitive Bacterial Attachment Mechanisms: A Review. *Frontiers in Microbiology* 2019; 10:191.
- Cochran DL, Simpson J, Weber H, Buser D (1994). Attachment and growth of periodontal cells on smooth and rough titanium. *Int J Oral Max Impl* 9:289-297.
- Deligianni DD, Katsala ND, Koutsoukos PG i in. (2012) Effects of surface roughness of hydroxyapatite on cell attachment and proliferation. *J Biotechnol* 22(1): 87-96.
- Gabriel BL, Gold J, Gristina AG i in. (1994) Site specific adhesion of *Staphylococcus epidermidis* (RP12) in Ti-Al-V metal systems. *Biomater* 15: 628-634.
- Hanein D, Geiger B, Addadi L (1994) Differential adhesion of cells to enantiomorphous crystal surfaces. *Science* 263: 1413-1416.
- Hanein D, Sabanay H, Addadi L i in. (1993). Selective interactions of cells with crystal surfaces. Implications for the mechanism of cell adhesion. *J Cell Sci* 104: 275-288.
- Hatano K, Inoue H, Kojo T i in. (1999) Effect of Surface Roughness on Proliferation and Alkaline Phosphatase Expression of Rat Calvarial Cells Cultured on Polystyrene. *Bone* 25, 439-445.
- Jung O, Smeets R, Kopp A i in. (2016) PEO-generated Surfaces Support Attachment and Growth of Cells *In Vitro* with No Additional Benefit for Micro-roughness in Sa (0.2-4 μm). *In vivo* 30: 27-34.
- Kieswetter K, Schwartz Z, Dean DD i in. (1996) The role of implant surface characteristics in the healing of bone. *Crit Rev Oral Biol Med* 7(4): 329–45.
- Parizek M, Slepickova Kasalkova N, Bacakova L i in. (2013) Adhesion, growth, and maturation of vascular smooth muscle cells on low-density polyethylene grafted with bioactive substances. *Biomed Res Int*, Article ID 371430,

- Ross AM, Jiang Z, Bastmeyer M i in. (2012) Physical aspects of cell culture substrates: topography, roughness, and elasticity. *Small* 6;8(3): 336-55.
- Schwartz Z, Martin JY, Dean DD, i in. (1996) Effect of titanium surface roughness on chondrocyte proliferation, matrix production, and differentiation depends on the state of cell maturation. *J. Biomed. Mater. Res Part B* 30:145-155.
- Yamashita D, Machigashira M, Miyamoto M i in. (2009) Effect of surface roughness on initial responses of osteoblast-like cells on two types of zirconia. *Dent Mat J* 28(4): 461–470.
- Washburn NR, Weir M, Anderson P, i in. (2004) Bone formation in polymeric scaffolds evaluated by proton magnetic resonance microscopy and X-ray microtomography. *J. Biomed. Mater. Res Part A* 69(4): 738-747.

6. BAM – nowoczesna technika badawcza substancji amfifilowych w czasie rzeczywistym

BAM - modern research technique of amphiphilic substances in real time

Ładniak Agata

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

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

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

Słowa Kluczowe: mikroskopia, filmy Langmuira, struktura cienkich warstw

Streszczenie

Mikroskopia kąta Brewstera (BAM) jest z powodzeniem wykorzystywana do nieinwazyjnego obrazowania monowarstw Langmuira na granicy faz powietrze-woda. Jednoczesna obserwacja i rejestracja struktury filmu w czasie rzeczywistym pozwala na uchwycenie dynamicznej aktywności, bez potrzeby stosowania jakichkolwiek środków mikroskopowych, które mogłyby zakłócać strukturę i zachowanie warstwy Langmuira. Tym badaniom mogą być poddane jedynie substancje, które wykazują specyficzną budowę, tzw. amfifilową (czyli posiadają część hydrofobową oraz hydrofilową), która umożliwia im orientowanie się na powierzchni międzyfazowej. Poniższy przegląd ma na celu przedstawienie, jak wiele parametrów można uzyskać oraz uświadomienie, jak różnorodnych informacji może dostarczyć wykorzystywana technika. Artykuł zawiera teoretyczne wyjaśnienie zasady działania mikroskopu oraz opis możliwości jakie z nich wynikają, jednocześnie znajdujące potwierdzenie w dostępnej literaturze.

1. Wstęp

Filmy monomolekularne tworzące się na granicach faz są miejscem wielu oddziaływań istotnych biologicznie. W efekcie czego, filmy te najczęściej określane monowarstwami, są szeroko stosowane jako modele biomembran umożliwiając analizę procesów zachodzących na powierzchni błon, składających się głównie z lipidów i białek. Wykorzystanie monowarstw w badaniach eksperymentalnych w roli modeli biomimetycznych pozwala na rygorystyczną kontrolę różnorodnych czynników, takich jak np. skład filmu, czy temperatura procesu. Dodatkowo bezpośrednia wizualizacja daje możliwość bardziej szczegółowej analizy zarówno architektury filmu, jak i zmian w przypadku interakcji z innymi cząsteczkami. Dlatego też, do realizacji tego celu techniki z dziedziny mikroskopii optycznej są jednymi z najpopularniejszych technik obrazowania. Przede wszystkim należy tu wymienić mikroskopię kąta Brewstera (BAM), która jest metodą nieinwazyjną, gdyż podczas pomiarów nie wymaga wprowadzania dodatkowych substancji.

Mikroskop kąt Brewstera (BAM) jest nowoczesnym urządzeniem służącym do badania cienkich warstw na powierzchni cieczy. Umożliwia on wizualizację monowarstw bądź filmów adsorpcyjnych Langmuira na granicy faz powietrze-ciecz w czasie rzeczywistym. Poza obserwacją zmian zachodzących w filmach podczas ich sprężania lub rozprężania, możliwe jest oszacowanie różnorodnych parametrów jak: grubość monomolekularnego filmu, orientacja przestrzenna obserwowanych substancji, a nawet procesów zachodzących pomiędzy poszczególnymi składnikami w warstwie, w wyniku czego można przewidywać rodzaj i siłę oddziaływań występujących pomiędzy nimi. Ponadto jest możliwa obserwacja zachodzących w strukturze zmian, separacji faz, wielkości domen ich kształtu i upakowania, optymalizacja parametrów osadzania, ustalenie kinetyki reakcji, jak również monitorowanie i wykrywanie materiałów powierzchniowo czynnych (m.in. adsorpcja białka, flotacja nanocząstek).

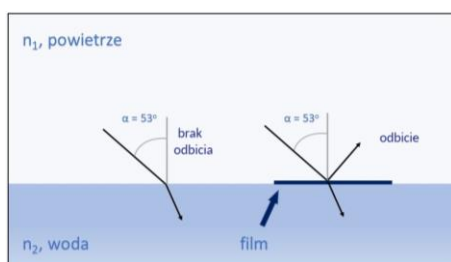
2. Opis zagadnienia

Mikroskopia kąta Brewstera jest nowoczesną, bardzo obiecującą techniką badawczą. Jednakże nie każdy zdaje sobie sprawę jak wiele użytecznych, a jednocześnie różnorodnych

parametrów można uzyskać przy jej wykorzystaniu. Poniższy przegląd ma na celu przedstawienie kilku przykładów potwierdzających wszechstronne użycie tej metody.

3. Zasada działania

Jak już było wspomniane, mikroskop kąta Brewstera (BAM) pozwala na zilustrowanie m.in. zmian zachodzących podczas sprężania pojedynczych warstw Langmuira lub filmów z zaadsorbowanymi różnego rodzaju substancjami znajdującymi się na granicy powietrze-woda. Działanie BAM opiera się na prawie załamania, czyli wykorzystuje współczynniki załamania światła dwóch ośrodków, mianowicie powietrza i cieczy. Stosunek tych współczynników nazywany jest prawem Snelliusa, opisującym zmianę drogi promienia światła podczas przechodzenia przez granicę faz dwóch ośrodków, które muszą różnić się między sobą wartością współczynnika załamania światła, oraz spełniają warunek przezroczystości. Prawo to jednocześnie pozwala na wyznaczenie odpowiedniego kąta padania światła spolaryzowanego na granicę faz, gwarantującego uzyskanie stanu, w którym promień padający nie będzie się odbijał (Rys. 1). Kąt, przy którym możliwa jest taka sytuacja nazywany jest kątem Brewstera (Sun i in. 2017).

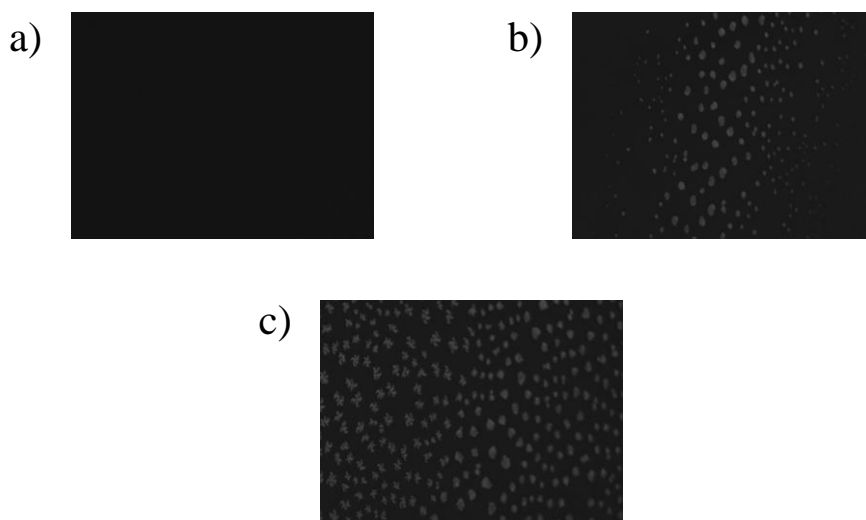


Rys. 1. Zasada działania BAM.

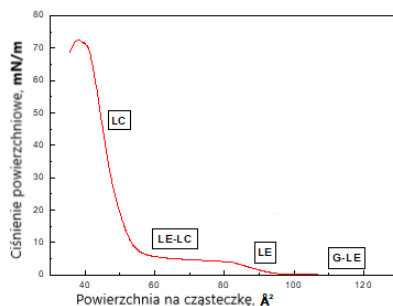
W konkretnym przypadku przedstawionym na Rys. 1 kąt Brewstera na granicy faz powietrze-woda wynosi 53° wówczas obraz otrzymany za pomocą BAM dla czystej wody wydaje się czarny (Rys. 2. a). Jakikolwiek dodanie/umieszczenie innego materiału na granicy powoduje zmiany w biegu wiązki światła generowanej w mikroskopie, w związku z czym następuje modyfikacja współczynnika załamania światła, co w efekcie przyczynia się do odbijania i wyświetlania niewielkiej ilości światła na obrazie (Rys. 2. b i c). Uzyskany obraz zawiera obszary o różnej jasności i uzależniony jest od obecności poszczególnych cząsteczek (Rys. 2. b) a także ich rozmieszczenia oraz gęstości upakowania (Rys. 2. c) w obszarze próbkowania. Z kolei ta informacja jakościowa jest również przydatna do analizy zachowania monofilmu. Rozprzestrzenianie się cienkiej warstewki molekularnej o współczynniku załamania innym niż współczynnik wody na jej powierzchni prowadzi do niewielkiego natężenia odbicia proporcjonalnego do kwadratu grubości cienkiej warstewki.

BAM jest techniką, która oprócz jakościowej informacji optycznej może dostarczyć informacje odnośnie strukturalnej analizy jakościowej. Jest to oparte na jego zdolności do obrazowania anizotropii dzięki występowaniu różnic podczas odbijania wiązki światła spolaryzowanego będących konsekwencją odmiennych właściwości grupy lipidowej polarnej głowy (Roldán-Carmona i in. 2012). Jest to również ważna zaleta metody BAM, gdyż analiza jedynie izoterm sprężania w tym przypadku może być niewystarczająca. Na Rys. 3 przedstawiono typową izotermę sprężania modelowej błony biologicznej zbudowanej z fosfolipidu DPPC (1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocholiny). Film lipidowy tuż po nałożeniu rozprzestrzenia się po całej możliwej powierzchni (czyli znajduje się na dużych obszarach molekularnych), w związku z czym oddziaływania pomiędzy poszczególnymi cząsteczkami są mocno ograniczone. Stan ten jest charakterystyczny dla zachowania błony znajdującej się w fazie gazowej (G). Podczas kompresji zmniejsza się powierzchnia dostępna dla cząsteczek, w efekcie zbliżają się one do siebie, a oddziaływania pomiędzy nimi są coraz silniejsze. Konsekwencją takiej sytuacji jest zmiana ich orientacji – łańcuchy węglowodorowe zaczynają przybierać pozycję pionową w stosunku do granicy faz. Jednocześnie zachodzi zmiana ich stanu z fazy z gazowej na fazę cieczy rozprężonej (LE), a dalej w stan cieczy skondensowanej (LC). Podczas, gdy monowarstwa znajduje się w znacznym stopniu

kompresji, niektóre lipidy, takie jak DPPC, wykazują region plateau, oznaczający współistnienie LE i LC prowadzące do tworzenia domen. (Ładniak i in. 2019). Po osiągnięciu maksymalnego ciśnienia następuje zapadnięcie się filmu w subfazę wodną lub powstanie wielowarstwy. Na izotermach π -A zobrazowane jest ono jako nagły spadek wartości ciśnienia powierzchniowego, a na obrazie z mikroskopu BAM występuje zaburzenie struktury filmu, zaczynają być zauważalne obszary o ciemnym zabarwieniu (czyli obszary przypisywane występowaniu subfazy wodnej). To ciśnienie zapadania się jest miarą stabilności filmu i może być jednocześnie użyte do ilościowego określenia wpływu ligandów destabilizujących (Baoukina i in. 2008). Jednak pomiary izoterm π -A dają jedynie wgląd we właściwości termodynamiczne, w związku z czym charakterystyka zjawisk strukturalnych na poziomie mezoskopowym jest wykluczona, gdy ta technika jest stosowana samodzielnie. Wprowadzenie równolegle w czasie rzeczywistym, oprócz rejestracji izoterm bardzo czułych technik obrazowania, umożliwiło nowy wgląd w morfologię mezoskopową i porządkowanie domen fazy skondensowanej (Vollhardt 2014).



Rys. 2. Obrazy uzyskane z mikroskopu kąta Brewstera podczas sprężania monowarstwy DPPC (1,2-dipalmitoilo-*sn*-glicero-3-fosfocholiny) techniką Langmuira dla: a) granicy fazy woda-powietrze, b) monowarstwy DPPC rozprzestrzonej na wodzie znajdującej się pod ciśnieniem bocznym 7 mN/m, c) monowarstwy DPPC rozprzestrzonej na wodzie znajdującej się pod ciśnieniem bocznym 9 mN/m.



Rys. 3. Schemat przebiegu izotermi π -A dla monowarstwy zbudowanej z fosfolipidu DPPC (1,2-dipalmitoilo-*sn*-glicero-3-fosfocholiny) w temperaturze 20°C. Symbole w ramkach oznaczają stan, w jakim znajduje się film monomolekularny, gdzie G – oznacza fazę gazową, LE – fazę cieczy rozprężonej, LC – fazę cieczy skondensowanej.

3.1 Możliwości wynikające z wykorzystania techniki BAM

Mikroskopia kąta Brewstera (BAM) jest potężną techniką, która głównie umożliwia wizualizację monowarstw Langmuira w czasie rzeczywistym. Jednakże dzięki temu możliwe jest uzyskanie szeregu innych wysoce użytecznych parametrów. Poprzez obserwację zachowania się filmów Langmuira podczas procesu sprężania (co jest możliwe dzięki sprzężeniu BAM z wanną Langmuira) możliwe staje się badanie organizacji bocznej filmów. W efekcie pozwala to na zaobserwowanie rozdziału faz, czy tworzenia się domen filmu monomolekularnego, które mogą mieć różnorodne rozmiary i kształty – uzależnione od jego właściwości. Istnieje szereg czynników wpływających na te cechy. Przede wszystkim są to: długość cząsteczki substancji tworzącej monowarstwę oraz obecność w jej strukturze wiązania podwójnego. Co ważne wykrycie tego jest możliwe w obrazach BAM, ale niewykonalne jedynie na podstawie analizy izoterm sprężania (izoterm ciśnienia powierzchniowego w funkcji powierzchni przypadającej na jedną cząsteczkę w monowarstwie) (Daear i in. 2017).

3.2 Wizualizacja kształtu domen za pomocą BAM

Obrazowanie za pomocą BAM daje możliwość oszacowania „formy” związku lub mieszaniny jaka może znajdować się w układzie badawczym. Warto zauważyć, że pomimo całkowitej zgodności izoterm $\pi - A$ enancjomerycznych i racemicznych monowarstw fosfolipidowych zaobserwowano wyraźną chiralną dyskryminację/rozróżnienie. Systematyczne badania monowarstw fosfolipidów wykazały, że chiralność jest zasadniczo widoczna w morfologii domeny. W stanie równowagi monowarstwy fosfolipidów tworzą domeny o różnych kształtach i teksturach wewnętrznych. Dostępne w literaturze wyniki badań wskazują na istnienie dużej różnorodności domen fazy skondensowanej, różniących się rozmiarami i kształtami mezoskopowymi, a także ich cechami teksturalnymi. Występujące „niezgodności” spowodowane są wrażliwością budowy chemicznej monowarstwy amfifilowej na warunki zewnętrzne układu, takie jak ciśnienie powierzchniowe i temperatura (Vollhardt 2014).

Przykładowo, naukowcy (Prenner i in. 2007) zaobserwowali znaczne odchylenia od idealnego upakowania w funkcji składu dwuskładnikowych mieszanin sfingomieliny (SM) i fosfatydylocholino (PC). Przy wysokich stężeniach SM (> 60% molowych) odnotowano stabilne domeny zbliżone kształtem do kształtu palców, natomiast w obszarze średnich stężeń (między 30 a 60% molowych) przybierały one kształty okrągłe, jednocześnie były one znacznie mniejsze co do wielkości. Domeny te były również bardzo stabilne aż do osiągnięcia ciśnienia powierzchniowego w pobliżu zakresu załamania monowarstwy, ponadto dalsza kompresja nie prowadziła do tworzenia bardziej jednorodnego filmu.

Z kolei obserwacja pojawiania się domen oraz charakterystyka ich kształtu pod wpływem obecności β -sitostanolu w mieszanych filmach z palmitoiloleilofosfatydyloetanoloaminą (POPE) i palmitoiloleilofosfatydyloseryną (POPS) pozwoliła na spostrzeżenie, iż pomimo zaniku zauważalnego przejścia fazowego LE-LC, pojawiają się domeny sugerujące jego istnienie, jednakże wartość ciśnienia powierzchniowego, przy którym są one dostrzegalne zmniejsza się wraz ze wzrostem zawartości β -sitostanolu w układzie z którymkolwiek z lipidów. Pojawiające się na obrazach BAM jasne plamki mogą świadczyć o tworzeniu się krystalitów a ich liczba wzrasta wraz z postępowaniem kompresji. Ponadto są one widoczne, aż do momentu załamania się monowarstwy, gdzie obserwuje się już krystality o znacznych rozmiarach. Hac-Wydro i in. (2013) sugerują, iż domeny te pochodzą od β -sitostanolu ze względu na niską mieszalność tego sterolu w monowarstwie fosfolipidowej.

3.3 Wykorzystanie BAM do określenia grubości monowarstwy

Układ optyczny BAM umożliwia nie tylko analizę przejść fazowych, topografii, kształtów domen filmów Langmuira w zależności od ich ciśnienia powierzchniowego, ale także pozwala na określenie grubości tworzącej się podczas kompresji monowarstwy, gdyż padająca na obecne w niej cząsteczki wiązka światła spolaryzowanego odbija się tylko tam, gdzie są one obecne, zaś natężenie światła odbitego jest proporcjonalne do kwadratu grubości cienkiej warstwy. Dzięki kalibracji wstępnej poziomów szarości kamery na subfazę wodną, możliwe jest dobre oszacowanie grubości

monowarstwy nałożonej na jej powierzchnię. To określenie jest tylko przybliżone, ponieważ konieczne jest uwzględnienie współczynnika załamania światła filmu, który zazwyczaj nie jest dokładnie znany. Przykładowo naukowcy Desbat and Castano (2013) dokonali pomiarów grubości dla monowarstwy cholesterolu uwzględniając współczynnik załamania światła 1,49, w ten sposób określono grubość dla monowarstwy cholesterolu rzędu $18 \text{ \AA} \pm 2 \text{ \AA}$ przy ciśnieniu 30 mN/m oraz odpowiednio $54 \text{ \AA} \pm 3 \text{ \AA}$ dla domen o wysokiej intensywności obserwowanych przy 45 mN/m. Otrzymane wyniki sugerują, że film cholesterolu przechodzi przemianę fazową z jednowarstwową do trójwarstwową przy ciśnieniu zapadania 40 mN/m.

Z kolei Fidalgo i in. (2019) którzy również dokonali analizy izoterm sprężania monowarstw utworzonych z cholesterolu, zaobserwowali, iż początkowo (gdy następuje przejście cząsteczek z fazy gazowej) średnia wartość grubości warstewki pozostaje stała i wynosi około 0,25 nm. Pierwszy nagły wzrost grubości filmu od 0,25 nm do 1,15 nm, jest związany z gwałtownym wzrostem ciśnienia powierzchniowego, dla którego grubość filmu stale rośnie, aż do osiągnięcia wartości 1,5 nm. Dodatkowo zaobserwowali, że na końcu tego płaskowyzu, zbiegającego się z załamaniem monowarstwy, ponownie następuje wzrost grubości filmu, który stabilizuje się przy średniej wartości około 3 nm. Pomimo różnic uzyskanych podczas kompresji w konkretnych wartościach grubości filmu monomolekularnego, obrazy otrzymane z mikroskopu BAM były zgodne z wcześniej zaproponowaną i opublikowaną płynną strukturą filmu cholesterolu.

Goggin i Samaniuk (2018) wykorzystali technikę BAM do obserwacji zmian jakie zachodziły podczas kompresji i dekompresji grafitu i grafenu na granicy faz powietrze-woda, w celu poszerzenia charakterystyki tych materiałów jako potencjalnych funkcjonalnych folii o kontrolowanym przewodnictwie i przezroczystości, które mogą być wytwarzane przy zastosowaniu metody osadzania w fazie ciekłej. Obrazy BAM wykonano podczas trzech cykli kompresji i rozprężania, czyli podczas rejestracji krzywych przedrelaksacyjnych i porelaksacyjnych. Na zdjęciach wykonanych podczas pierwszego cyklu zaobserwowano mniejsze, bardziej równomiernie rozmieszczone aglomeraty przed kompresją oraz większe, bardziej rozproszone aglomeraty podczas ekspansji i po niej. Ponadto w kolejnych cyklach odnotowano narastające zgrubienie na granicy faz, sugerując powstawanie większych agregatów, dodatkowo pomiędzy nimi pojawiły się duże puste przestrzenie. Ostatecznie wywnioskowano, iż scalenie materiału grafitowego w wyniku aglomeracji cząstek lub układania arkuszy grafenu odbywa się w sposób ciągły i objawia się spadkiem ciśnienia powierzchniowego, podczas gdy cząstki o grubości rzędu nanometra i kilkudziesięciu nanometrów są w stanie pokonać te oddziaływania dzięki energii cieplnej.

Co ciekawe, mikroskopia kąta Brewstera może być wykorzystana do określania grubości nie tylko materiałów modelowych, ale także materiałów biologicznych. Tego typu eksperymentów podjęła się niezależna grupa badawcza z Niemiec (Winsel i in. 2003). Postanowili oni prześledzić proces adsorpcji materiału powierzchniowo czynnego płynu pobranego z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (BAL) na granicy faz powietrze/woda w temperaturze 37°C. Pierwsze obserwacje dotyczyły wzrostu ciśnienia powierzchniowego początkowo z wartości 26 mN/m do 44 mN/m w stanie równowagi, czemu towarzyszyło jednoczesne ciągłe wzrastanie grubości filmu utworzonego z materiału biologicznego posiadającego niejednorodny charakter. W stanie równowagi adsorpcji grubość BAL wynosiła około 12 nm – co sugeruje, iż jest to struktura wielowarstwowa.

3.4 Badania BAM substancji biologicznych na granicy faz powietrze-woda

Kolejnym istotnym zastosowaniem BAM jest oznaczanie aktywności enzymów w monowarstwach Langmuira. Białko będące przedmiotem zainteresowania można wprowadzić do układu różnymi sposobami, np. poprzez wstrzyknięcie do subfazy po osadzeniu warstewki substratu, włączyć do podfazy przed osadzeniem warstewki substratu lub dodać przez nakropieniem monowarstwy. Ważne jest, aby substrat białkowy był aktywny powierzchniowo, gdyż spełnienie tego warunku umożliwi monitorowanie interakcji między enzymem a substratem na granicy faz.

Mate i in. (2014) wykorzystali obrazowanie przy pomocy mikroskopu BAM do wizualizacji wprowadzenia białka α -hemolizyny *Escherichia coli* do trójskładnikowych mieszanin fosfatydylocholiny, sfingomieliny o różnej długości i płynności łańcucha oraz cholesterolu. Analiza

uzyskanych obrazów pozwoliła na wyciągnięcie wniosku, że hemolizyna przedostaje się do obu faz lub że jej wprowadzenie do jednej fazy powoduje wpływ na drugą fazę.

Z kolei Wnętrzak i in. (2012) dokonali określenia właściwości błonotwórczych, alkilofosfocholinowego leku przeciwnowotworowego, tj. Erucylofosfocholiny. Badania zostały oparte o analizę izoterm ciśnienia powierzchniowego w funkcji powierzchni przypadającej na cząsteczkę ($\pi - A$) uzyskanych techniką Langmuira, obliczonych na podstawie uzyskanych danych – modułów ściśliwości, oraz topografii przy wykorzystaniu mikroskopu kąta Brewstera. Naukowcy doszli do wniosku, iż czynniki takie, jak: temperatura subfazy, siła jonowa, szybkość kompresji oraz liczba cząsteczek rozmieszczonych na powierzchni praktycznie nie mają wpływu na charakterystykę filmów Erucylofosfocholiny, leku który w każdym z przeprowadzonych eksperymentów tworzył bardzo stabilne monowarstwy Langmuira. Ponadto potwierdzono jej ciekły charakter, określony ilościowo za pomocą wartości modułu ściskania, który osiągnął maksymalną wartość ok. 80 mN /m, co spełnia kryterium charakteru płynnego, oraz jednorodnością/homogenicznością filmu podczas całego procesu kompresji na obrazach uzyskanych przy wykorzystaniu BAM.

Interesujące badania przeprowadzili także naukowcy z Arabii Saudyjskiej (Mandal i in. 2016), którzy sprawdzali wpływ różnych czynników na proces usuwania cholesterolu z układu ceramid/cholesterol przy zastosowaniu metylo-beta-cyklodekstryny (M β CD). Ten związek według naukowców jest najskuteczniejszym środkiem służącym do usuwania cholesterolu (Chol) z biomembran. Odnotowali oni, iż stopień w jakim Chol był usuwany - nie zależał od jego pierwotnej ilości w układzie, co było wielkim zaskoczeniem, gdyż w większości mieszanych monowarstw lipidowych zawartość Chol miała istotny wpływ. Ponadto podczas zachodzenia procesu zubożania cholesterolu zaobserwowano również zmiany morfologiczne domen, w postaci pęknięć monowarstw, których ilość zwiększa się wraz z upływem czasu.

4. Podsumowanie

Na podstawie przedstawionego skrótego przeglądu literaturowego można stwierdzić, że technika wykorzystująca mikroskop BAM zrewolucjonizowała wizualizację monowarstw na granicach faz, umożliwiając uzyskanie ich fizyko-chemicznej charakterystyki w czasie rzeczywistym bez ingerencji w strukturę badanych filmów. Sprzężenie ich z wanną lub wannami Langmuira, było dużym, bardzo wartościowym przedsięwzięciem, gdyż umożliwiło to dostrzeżenie nawet słabych oddziaływań, które prowadziły jedynie do niewielkich zmian izoterm ciśnienia powierzchniowego w funkcji powierzchni ($\pi - A$), czasami ledwie zauważalnych a jednocześnie powodowały znaczne zmiany w organizacji filmu. Zatem zastosowanie mikroskopii optycznej zapewnia uzyskanie ważnych dodatkowych informacji, pozwalających lepiej zrozumieć potencjalny wpływ makrocząsteczek, nośników leków, leków lub innych nanocząstek na układy istotne z biologicznego punktu widzenia.

Technika BAM w ciągu ostatnich kilku (kilkunastu lat) stała się niezbędnym narzędziem, istotnym zarówno dla zastosowań biologicznych, jak i technicznych, prowadząc do opracowania nowych materiałów i biomateriałów. Szerokie i wciąż rosnące zainteresowanie wykorzystaniem BAM, potwierdzone licznymi publikacjami, udowadnia, że jest to stale rozwijająca się dziedzina, z którą związane są znaczne nadzieje obecnie przeprowadzanych badań i tych w przyszłości.

5. Literatura

- Baoukina S, Monticelli L, Risselada HJ i in. (2008) The molecular mechanism of lipid monolayer collapse. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105: 10803–10808.
- Daear W, Mahadeo M, Prenner EJ (2017) Applications of Brewster angle microscopy from biological materials to biological systems. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1859(10): 1749-1766.
- Desbat B, Castano S (2013) Brewster Angle Microscopy and Imaging Ellipsometry. In: Roberts G.C.K. (eds) *Encyclopedia of Biophysics*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Fidalgo Rodriguez JL, Caseli L, Minones Conde J i in. (2019) New look for an old molecule – Solid/solid phase transition in cholesterol monolayers. *Chem Phys Lipids* 225: 104819.

- Goggin DM, Samaniuk JR (2018) Dynamics of pristine graphite and graphene at an air-water interface. *AIChE Journal* 64(8): 3177-3187.
- Hac-Wydro K, Lenartowicz R, Dynarowicz-Latka P (2013) The influence of plant stanol (beta-sitostanol) on inner leaflet of human erythrocytes membrane modeled with the Langmuir monolayer technique. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 102: 178–188.
- Ładniak A, Jurak M, Wiącek AE (2019) Langmuir monolayer study of phospholipid DPPC on the titanium dioxide–chitosan–hyaluronic acid subphases. *Adso* 25: 469–476.
- Mandal P, Noutsi P, Chaieb S (2016) Cholesterol Depletion from a Ceramide/Cholesterol Mixed Monolayer: A Brewster Angle Microscope Study. *Sci Rep.* 6: 26907.
- Mate SM, Vazquez RF, Herlax VS i in, (2014) Boundary region between coexisting lipid phases as initial binding sites for *Escherichia coli* alpha-hemolysin: a real-time study. *Biochim Biophys Acta* 1838; 1832–1841.
- Prenner E, Honsek G, Hönl D i in, (2007) Imaging of the domain organization in sphingomyelin and phosphatidylcholine monolayers. *Chem. Phys. Lipids* 145: 106–118.
- Roldán-Carmona C, Giner-Casares JJ, Pérez-Morales M i in. (2012) Revisiting the Brewster Angle Microscopy: the relevance of the polar headgroup. *Adv. Colloid Interf. Sci.* 173: 12–22.
- Sun Z, Zheng D, Baldelli S (2017) Distortion Correction for a Brewster Angle Microscope Using an Optical Grating. *Anal Chem.* 89(4): 2186–2190.
- Vollhardt D (2014) Brewster angle microscopy: A preferential method for mesoscopic characterization of monolayers at the air/water interface. *Curr Opin Colloid In* 19(3): 183-197.
- Winsel K, Hönl D, Lunkenheimer K i in. (2003) Quantitative Brewster angle microscopy of the surface film of human broncho-alveolar lavage fluid. *Eur Biophys J* 32(6): 544-52.
- Wnętrzak A, Łatka K, Marzec M i in. (2012) Langmuir Monolayer Characteristics of Erucylphosphocholine — A Novel Anti-Tumor Drug. *Acta Physica Polonica A* 121(2): 468-473.

7. Wykorzystanie filmów biopolimerowych jako nośników kofeiny

Use of biopolymer films as carriers of caffeine

Katarzyna Łupina, Justyna Bochnak-Niedźwiecka

Katedra Biochemii i Chemii Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii,
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Słowa kluczowe: polisacharydy, rozpuszczalność, kontrolowane uwalnianie

Streszczenie

Na przestrzeni ostatnich lat przeprowadzono wiele badań skupiających się na aspekcie kontrolowanego uwalniania substancji aktywnych z różnorodnych matryc (nośników) otrzymywanych z udziałem biodegradowalnych polimerów pochodzenia naturalnego oraz ich pochodnych. Celem badań przedstawionych w niniejszej pracy było zbadanie możliwości wykorzystania wybranych polisacharydów jako nośników kofeiny, umożliwiających jej kontrolowane uwalnianie w czasie. Matryce w postaci filmów otrzymano z wodnych roztworów mieszaniny agaru (AGR), hydroksypropylometylocelulozy (HPMC), karboksymetylocelulozy (CMC), utlenionej skrobi ziemniaczanej (USZ) oraz glicerolu pełniącego rolę plastyfikatora. Filmy z dodatkiem i bez dodatku kofeiny (kontrolne) uzyskiwano metodą rozprowadzenia cienkiej warstwy roztworu polimerów wraz z dodatkami, a następnie usunięcia rozpuszczalnika poprzez odparowanie (25°C, 24h). Analiza fizykochemiczna filmów obejmowała pomiary grubości, pH, barwy, rozpuszczalności i kinetyki uwalniania kofeiny.

Przeprowadzone badania wykazały, że dodatek kofeiny spowodował znaczny wzrost grubości filmów, ale tylko nieznacznie zmieniła pH nośników. Zaobserwowano, że filmy inkorporowane kofeiną były białe (nieprzezroczyste), jak również charakteryzowały się większym udziałem barwy czerwonej i żółtej. Rozpuszczalność i stopień uwalniania filmów były uzależnione głównie od materiału z którego wykonano matryce. Z wyjątkiem filmów otrzymanych na bazie CMC i CMC/HPMC, które były w pełni rozpuszczalne w wodzie, inkorporacja kofeiną spowodowała zwiększenie podatności filmów na rozpuszczanie. Spośród wszystkich badanych próbek filmy uzyskane z mieszaniny USZ/AG wykazywały najwolniejsze tempo uwalniania kofeiny.

1. Wstęp

Nieustanny rozwój przemysłu farmaceutycznego pozwala uzyskać formy leków, które charakteryzują się coraz lepszymi efektami terapeutycznymi. Jednym ze sposobów ulepszenia działania preparatów leczniczych jest modyfikacja farmakokinetyki uwalniania substancji czynnej. Dzięki wykorzystaniu różnorodnych systemów kontrolowanego uwalniania (z *ang.* *DDS- Drug Delivery Systems*) możliwe jest uzyskanie środków charakteryzujących się zarówno szybkim jak i długotrwałym działaniem. W zależności od metody produkcji oraz materiału z którego został wykonany nośnik leku możemy wyróżnić środki o przedłużonym, opóźnionym, pulsacyjnym lub przyspieszonym uwalnianiu. Najpopularniejszym sposobem uzyskania leków o zmodyfikowanej kinetyce uwalniania jest wykorzystanie nośników biopolimerowych, których zaletą jest stosunkowo prosta technologia ich wytwarzania pozwalająca otrzymać jednorodne materiały. Dodatkowo, dzięki różnorodności polimerów możliwe jest uzyskiwanie odmiennych profili uwalniania. W systemach nośnikowych substancja aktywna jest najczęściej równomiernie rozpuszczona lub rozproszona w matrycy polimerowej. Matryce mogą ulegać pęcznieniu w przewodzie pokarmowym (np. w żołądku) lub wręcz przeciwnie – rozpuszczać się już w jamie ustnej. Matryce pierwszego rodzaju często wytwarzane są z polimerów, które absorbują wodę. Należą do nich m.in. różnego rodzaju pochodne celulozowe (metyloceluloza, HPMC) czy też alginiany. Mechanizm kontrolowanego uwalniania substancji aktywnych z polimerowych systemów matrycowych może opierać się na aktywnej dyfuzji substancji, osmozie lub erozji matrycy polimerowej (Haznar-Garbacz i Garbacz 2009; Shaik i in. 2012).

Jako systemy uwalniania substancji czynnej bardzo często wykorzystuje się matryce hydrożelowe. Hydrokoloidy wykorzystywane do ich otrzymywania tworzą trójwymiarową

usieciowaną strukturę i charakteryzują się dużą zdolnością absorpcji i utrzymywania wody. Ponadto pożądane jest aby polimery wykorzystywane do produkcji nośników wykazywały dobrą integralność mechaniczną, nietoksyczność, oraz określoną odporność na czynniki chemiczne i temperaturę. Nośniki hydrożelowe są popularne ponieważ cechuje je biodegradowalność (mikroorganizmy w odpowiednich warunkach rozkładają hydrożele wydzielając dwutlenek węgla, wodę i amoniak) oraz biogodność (materiały z którego powstają nośniki oraz produkty ich rozkładu nie są toksyczne) (Tyliszczak i Pielichowski 2007).

Systemy kontrolowanego uwalniania można stosować do dostarczania (do organizmu) różnych substancji aktywnych. Kofeina (w zależności od pochodzenia botanicznego nazywana również teiną guaraniną lub mateiną) należy do alkaloidów purynowych i przybiera postać białego, krystalicznego proszku, który charakteryzuje się gorzkim smakiem. Związek ten jest obecnie najbardziej rozpowszechnioną psychoaktywną substancją na świecie. Naturalnymi źródłami kofeiny są napary z różnych gatunków ziaren kawowca (*Coffea arabica*, *Coffea canephora*), krzewu herbacianego, (*Camelia sinensis*), liany brazylijskiej paulinia guarana (*Paulinia guarana*) oraz ostrokrzewu paragwajskiego Mate (*Ilex paraguayensis*). Obecna jest również w zarodkach nasion koli (*Cola vera*). Na rynku dostępnych jest wiele leków i suplementów zawierających kofeinę. Ponadto stanowi ona popularny dodatek do napojów energetycznych oraz typu cola. Według dostępnych danych literaturowych w ciągu dnia jedna osoba spożywa średnio 200 mg kofeiny (Dworzański i in. 2011; Bojarowicz i Przygoda 2012).

Wpływ kofeiny na organizm człowieka to temat kontrowersyjny, ponieważ związek powoduje zarówno negatywne jak i pozytywne skutki zdrowotne. Mechanizm działania substancji opiera się głównie na hamowaniu receptorów adenozyliny A1 i A2, co prowadzi do stymulacji centralnego układu nerwowego. Na skutek działania kofeiny wzrasta stężenie enzymu cykazy adenylnowej, co z kolei prowadzi do wzrostu stężenia cyklicznego adenozylo-3',5'-monofosforanu (cAMP) w komórce. Działanie kofeiny zależy od spożytej dawki oraz indywidualnych cech organizmu wpływających na szybkość jej wchłaniania. Spożycie kofeiny skutkuje przyspieszeniem bicia serca, rozszerzeniem naczyń krwionośnych, przyspieszeniem lipolizy w komórkach, wzmożonym wytwarzaniem wielu neuroprzekaźników np. acetylocholinę, a także zwiększeniem aktywności dopaminy. W konsekwencji następuje wzrost koncentracji i zmniejszenie senności, co jest głównym powodem spożywania używek zawierających kofeinę. Co więcej, według niektórych badań długotrwałe przyjmowanie kofeiny może zmniejszyć ryzyko wystąpienia chorób neurodegeneracyjnych, np. Parkinsona i Alzheimera. Z drugiej strony nadmierne spożywanie kofeiny, zwłaszcza w późnych godzinach wieczornych, może prowadzić do bezsenności co z kolei skutkuje obniżonym samopoczuciem, a nawet wystąpieniem zaburzeń psychicznych takich jak depresja. Kofeiny powinny się wystrzegać osoby cierpiące na schorzenia gastroenterologiczne, ponieważ substancja może nasilać objawy refluksu przełyku oraz sprzyjać rozwojowi wrzodów żołądka po przez stymulację wydzielania kwasu solnego (Bojarowicz i Przygoda 2012; Zdrojewicz i in. 2016). W przypadku ww. osób, stopniowe uwalnianie kofeiny w przewodzie pokarmowym może przynieść wymierne korzyści zdrowotne, tj. zmniejszyć negatywny wpływ na układ pokarmowy. Celem badań przedstawionych w niniejszej pracy było wykorzystanie wybranych polisacharydów do otrzymania nośników, które pozwoliłyby na modyfikację kinetyki uwalniania kofeiny.

2. Materiały i Metody

Materiały wykorzystane do badań:

- agar (Sigma Aldrich, USA),
- hydroksypropylometyloceluloza (Sigma Aldrich, USA)
- karboksymetyloceluloza (Wolfcelulosics, Niemcy),
- utleniona skrobia ziemniaczana LU-1400-3 (WPRZ S.A. Luboń, Polska),
- kofeina (Sigma Aldrich, USA),
- glicerol (Sigma Aldrich, USA).

Filmy otrzymywano z 5 % (m/m) wodnych roztworów polimerów, zawierających glicerol (2 % m/m), który pełnił rolę plastyfikatora. Roztwory filmotwórcze otrzymywano z roztworów monopolimerowych (CMC, USZ) jak również z roztworów dwupolimerowych: CMC/AGR (4:1), USZ/AGR (4:1), CMC/HPMC (4:1), USZ/HPMC (4:1). Polimery i glicerol rozpuszczono w wodzie destylowanej o temp. 90 °C przez okres 1h. Następnie do każdego roztworu dodano kofeinę w takiej ilości aby pojedyncze filmy zawierały 200 mg substancji. Filmy formowano przez naniesienie 13,26 g roztworu na wypoziomowaną płytkę wykonaną z polichlorku winylu (PCV) o powierzchni 13,26 cm² i suszenie w temp. 25 °C przez około 24 h. Otrzymane filmy poddano klimatyzacji w komorze klimatycznej (MLR-350, Sanyo Electric Biomedical Co.) w temperaturze 25 °C i wilgotności względnej (RH) 50% przez 24h. Otrzymano zarówno filmy kontrolne bez dodatku kofeiny jak i filmy inkorporowane tym związkiem.

Pomiar grubości filmów wykonano przy użyciu ręcznego grubościomierza (Mitotuyo Serial No, 7327) z dokładnością do 2 µm. Próbkę badano w kilku miejscach, uzyskane wyniki uśredniano. Pomiar pH filmów wykonano za pomocą pH-metru Elemetron CP-401 przy użyciu elektrody Elmetron EPX-3. W celu zmierzenia pH filmów na powierzchni próbki umieszczono 20 µl wody, po czym umieszczano elektrodę na powierzchni filmu i po upływie 2 minut odczytywano zmierzoną wartość. Barwę filmów określano w systemie CIE L*a*b* z wykorzystaniem kolorymetru NH-310. Przed wykonaniem badania, kolorymetr skalibrowano na wzorcu bieli. Pomiar barwy przeprowadzano w trzech powtórzeniach z zastosowaniem czarnego tła (L* = 21,86; a* = 0,80; b* = 6,51), następnie wyniki uśredniono. W celu określenia rozpuszczalności matryc, klimatyzowane próbki o powierzchni 13,26 cm² zważono z dokładnością do 0,001 g, następnie umieszczono w szczelnie zamkniętych butelkach napełnionych 200 ml wody destylowanej o temperaturze 37 °C. Po upływie 24h, ostrożnie zlano roztwór z nad próbki, następnie nierozpuszczoną część próbki przepłukiwano wodą destylowaną i ostatecznie suszono w temperaturze 25 °C, 50% RH, przez 48h.

Rozpuszczalność matryc w wodzie obliczono zgodnie według wzoru:

$$\text{Rozpuszczalność s.s. [\%]} = (m_o - m_r) / m_o \times 100\%$$

gdzie:

m_o- masa próbki przed rozpuszczeniem [g],

m_r- masa próbki po rozpuszczeniu i wysuszeniu [g].

W celu zbadania uwalniania kofeiny z matrycy polimerowej, klimatyzowane próbki o powierzchni 13,26 cm² umieszczono w szczelnie zamkniętych butelkach napełnionych 200 ml wody destylowanej o temperaturze 37 °C. Próbki następnie wytrząsano (30 rpm, Benchmark, Incu-Shaker Mini) i pobierano 0,5 ml płynu akceptorowego po upływie 1, 5, 15, 30, 60, 120 minut. Oznaczenie stężenia kofeiny wykonano przy użyciu spektrofotometru (Perkin-Elmer Lambda 40) przy długości fali λ=270 nm (Belay i in. 2008). Zawartość kofeiny obliczono na podstawie krzywej wzorcowej zgodnie z równaniem: $y = 50,56x + 0,999$.

3. Wyniki i Dyskusja

Grubość matrycy biopolimerowej w dużej mierze zależy od właściwości samego roztworu (lepkość, gęstość, napięcie powierzchniowe) z którego ją otrzymano oraz metody wytwarzania (Pająk i in. 2013). Tabela 1. przedstawia grubość filmów biopolimerowych kontrolnych i z dodatkiem kofeiny. Na podstawie pomiaru stwierdzono że grubość filmów kontrolnych przyjmowała wartości w przedziale 73-207 µm. Wprowadzenie kofeiny do matrycy spowodowało znaczne zwiększenie grubości filmów (876-1283 µm). W przypadku filmu otrzymanego z CMC zaobserwowano aż ~18 krotny przyrost grubości, z kolei najmniejszą zmianę grubości odnotowano w przypadku filmu na bazie CMC/HPMC (~5,5 krotny wzrost badanej cechy). Znaczny przyrost grubości filmów jest spowodowany zwiększeniem udziału suchych składników w składzie filmów, tj. obecnością aż 200 mg kofeiny. Dodatkowo, zaobserwowano, że związek naruszył integralność matrycy biopolimerowej w wyniku czego otrzymane filmy były nierówne i chropowate.

Obecność kofeiny nieznacznie wpłynęła na pH filmów (Tabela 1). Wartości pH próbek kontrolnych utrzymywała się w przedziale 5,85-7,23. Karta charakterystyki kofeiny (Sigma Aldrich, 2017) wskazuje że związek daje delikatnie kwaśny odczyn, tj. pH w przedziale 5,5-6,5 (10g/l).

Tab. 1. Grubość, pH i rozpuszczalność filmów bez dodatku kofeiny (0) i inkorporowanych kofeiną (K). AGR-agar, HPMC-hydroksypropylometyloceluloza, CMC-karboksymetyloceluloza, USZ-utleniona skrobia ziemniaczana.

Film	Grubość [μm]	pH	Rozpuszczalność [%]
CMC 0	73±8	6,51± 0,01	100±0,00
CMC K	1283±2887	6,58±0,00	100±0,00
USZ 0	126±8	5,85±0,02	43,11±1,2
USZ K	11167±104	5,89± 0,01	87,18±3,2
CMC/AG 0	140±35	6,70±0,03	86,26±1,4
CMC/AG K	877±108	6,62±0,00	96,18±5,4
USZ/AG 0	98±3	5,91±0,04	40,98±2,6
USZ/AG K	963±55	6,10±0,05	77,81±7,1
CMC/HPMC 0	207±3	7,23± 0,01	100±1,0
CMC/HPMC K	1121±25	6,64±0,00	100±0,5
USZ/HPMC 0	102±20	5,90±0,02	64,65±1,1
USZ/HPMC K	1167±115	6,10±0,03	86,31±0,7

Zmiany kwasowości były zależne przede wszystkim od pH wyjściowego matryc biopolimerowych. Dodatek kofeiny spowodował spadek kwasowości tylko w przypadku filmów o wysokim pH początkowym (CMC/AG i CMC/HPMC). W pozostałych matrycach odnotowano odwrotną zależność tj. niewielki wzrost pH (średnio o 0,12).

Stopień rozpuszczalności filmów kontrolnych i inkorporowanych kofeiną przedstawiono w Tabeli 1. Filmy na bazie CMC oraz CMC/HPMC jako jedyne były w 100% rozpuszczalne, niezależnie od inkorporacji kofeiną. Całkowita rozpuszczalność matryc, których składową jest CMC wynika z budowy tego polisacharydu. Polimer jest zmodyfikowaną formą celulozy otrzymywaną w wyniku reakcji alkalicelulozy z chlorooctanem sodu, dlatego łatwo rozpuszcza w ciepłej wodzie (Szymański i in. 2015). Podobne wyniki dotyczące szybkiej i całkowitej rozpuszczalności matryc otrzymanych z CMC uzyskali Mohammadi i in. (2018). Dodatek AG do matryc spowodował zmniejszenie podatności na rozpuszczalność, zarówno w przypadku filmów na bazie CMC (spadek o 13,74%), jak i USZ (spadek o 2,13%). W temperaturze 37°C AG przyjmuje formę żelu, co jak można wnioskować powoduje obniżenie rozpuszczalności filmów. AG ulega ponownemu rozpuszczeniu dopiero po podgrzaniu do temperatury powyżej 85 °C (Armisen i Galatas 2009). Z kolei dodatek HPMC do filmów na bazie USZ, spowodował wzrost rozpuszczalności o 21,54%. Wcześniejsze badania Brindle i Krochta (2008) również wykazały możliwość wzrostu rozpuszczalności filmów po wprowadzeniu tego polisacharydu do matryc otrzymanych na bazie izolatu białka serwatkowego. Za wyjątkiem filmów z CMC i CMC/HPMC, dodatek kofeiny spowodował zwiększenie podatności nośników na rozpuszczalność. Wyjaśnieniem tego zjawiska, jest najprawdopodobniej zmniejszenie integralności filmów na skutek obecności kofeiny, która utrudniała utworzenie spójnej sieci polimerowej. Ponadto, wiadomym jest że kofeina jest rozpuszczalna w wodzie o (2 g/100 ml, 25°C) i jej rozpuszczalność wzrasta wraz ze wzrostem temperatury (Karta charakterystyki kofeiny Sigma Aldrich 2017).

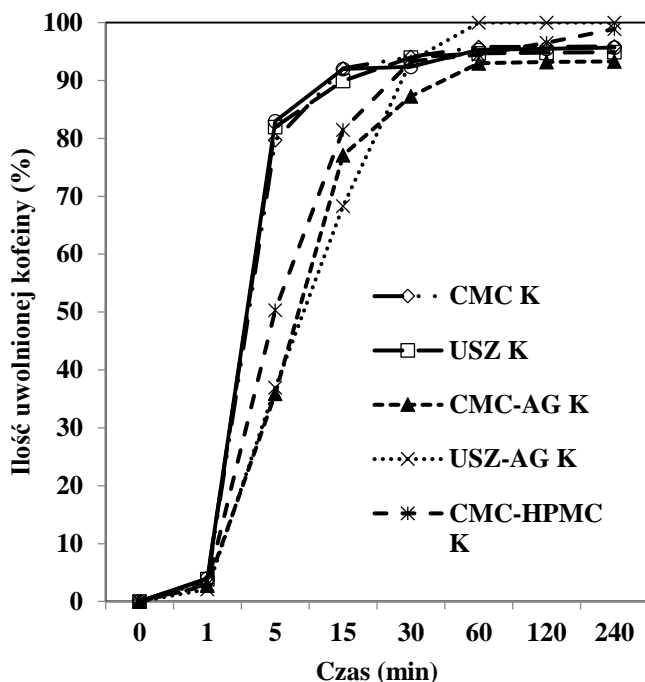
Tab. 2. Barwa filmów bez dodatku kofeiny (0) i inkorporowanych kofeiną (K). AGR-agar, HPMC-hydroksypropylometyloceluloza, CMC-karboxymetyloceluloza, USZ-utleniona skrobia ziemniaczana.

Film	L*	a*	b*
CMC 0	50,50±0,70	-0,37±0,05	-3,49±0,02
CMC K	99,95±0,03	2,59±0,38	-1,89±0,00
USZ 0	48,76±0,80	0,15±0,12	-4,21±0,21
USZ K	99,98±0,00	2,88±0,09	2,2±1,41
CMC/AG 0	49,40±0,09	-0,18±0,02	3,38±0,00
CMC/AG K	99,78±0,01	2,14±0,28	6,83±2,40
USZ/AG 0	46,44±1,82	-0,13±0,04	-3,8±0,36
USZ/AG K	97,16±0,22	0,06±0,02	-2,21±0,10
CMC/HPMC 0	46,26±0,01	-0,07±0,08	3,76±0,18
CMC/HPMC K	99,83±0,28	2,52±0,08	3,95±1,50
USZ/HPMC 0	43,47±0,39	-0,19±0,03	-4,12±0,12
USZ/HPMC K	99,92±0,00	2,89±0,08	2,51±0,92

W Tabeli 2. przedstawiono parametry barwy filmów. Składowa L* określająca jasność filmów kontrolnych przyjmowała wartości od 43,47 do 50,50. W przypadku filmów z kofeiną zaobserwowano wzrost parametru L* dla każdego analizowanego nośnika do wartości ~99, co oznacza że w porównaniu do próbek kontrolnych filmy z kofeiną były bielsze (tj. nieprzezroczyste na czarnym tle). Parametr a* określa natężenie barwy od zielonej do czerwonej, z kolei b* od niebieskiej do żółtej. Dodatek kofeiny, niezależnie od rodzaju matrycy polimerowej, spowodował istotne zwiększenie udziału barwy czerwonej oraz żółtej w widmie odbiciowym próbek. Spośród próbek inkorporowanych kofeiną największe natężenie czerwonej barwy zaobserwowano w przypadku filmów USZ/HPMC (2,89), natomiast najbardziej żółte okazały się filmy otrzymane z CMC/AG (6,83).

Rys. 1 przedstawia tempo migracji kofeiny z badanych filmów do płynu akceptorowego (woda o temp. 37 °C). Spośród wszystkich analizowanych próbek kofeina najwolniej uwalniała się z matrycy na bazie USZ/AG. Ilość uwolnionego związku po upływie 5 minut wyniósł 36,99% ilości początkowej. Większe ilości kofeiny przeniknęły do płynu akceptorowego po upływie 5 minut w przypadku filmów CMC/AG (48,85%) i CMC/HPMC (50,34%). Spowolnienie tempa uwalniania kofeiny w przypadku USZ/AG i CMC/AG jest spowodowane obecnością AG, który ulega żelowaniu w temperaturze 37°C i opóźnia przenikanie (dyfuzję) substancji czynnej do płynu akceptorowego. Jak przedstawiono w Tabeli 1, film kofeinowy otrzymany na bazie USZ/AG wykazywał najmniejszą rozpuszczalność spośród wszystkich badanych próbek, co mogło warunkować zaobserwowaną niską szybkość uwalniania kofeiny. Również dodatek HPMC pozwolił opóźnić migrację kofeiny (rys. 1).

Badania przeprowadzone przez Nellore i in. (1998) udowodniły, że wykorzystanie wysokich stężeń HPMC pozwala spowolnić leku (metoprol) nawet o 10 godzin. Szybkość uwalniania kofeiny z pozostałych matryc była znacznie większa i mieściła się w granicach od 79,71 do 82,97%. Po upływie 15 minut z filmów USZ/AG, CMC/AG i CMC/HPMC uwolniło się odpowiednio 68,33, 77,14% i 81,49% kofeiny. W pozostałych matrycach migracja substancji była znacznie intensywniejsza, tj. ilość uwolnionej kofeiny wynosiła ~92%. Po upływie 1 h nastąpiło całkowite uwolnienie kofeiny z matrycy USZ/AG. W przypadku pozostałych nośników, po tym czasie, jak również po upływie 2 h, ilość kofeiny która przeniknęła do płynu akceptorowego wynosiła ≥90%.



Rys. 1. Szybkość migracji kofeiny z filmów do płynu akceptorowego (woda o temp. 37°C). AGR-agar, HPMC-hydroksypropylometyloceluloza, CMC-karboksymetyloceluloza, USZ-utleniona skrobia ziemniaczana.

4. Wnioski

Przeprowadzone badania wykazały, że wprowadzenie kofeiny do matrycy polimerowej powoduje znaczny wzrost grubości filmów, co jest skutkiem zwiększonego udziału suchych składników i braku jednorodności topografii matryc. Dodatek kofeiny spowodował wzrost pH filmów, których kwasowość wyjściowa osiągnęła wartość powyżej 6,6; z kolei odwrotną zależność (tj. spadek pH) zaobserwowano w przypadku nośników o pH powyżej 6,6. Filmy inkorporowane kofeiną były białe oraz charakteryzowały się większym udziałem barwy czerwonej i żółtej w porównaniu do nośników kontrolnych. Rozpuszczalność matryc uzależniona była od materiału z którego były wykonane oraz obecności kofeiny. Filmy otrzymane na bazie CMC i CMC/HPMC, zarówno bez jak i z dodatkiem kofeiny, były całkowicie rozpuszczalne. W niniejszej pracy udowodniono, że obecność AGR w składzie nośników pozwoliła ograniczyć rozpuszczalność próbek oraz spowolnić uwalnianie kofeiny. Ograniczenie migracji substancji do płynu akceptorowego udało się również uzyskać poprzez dodanie HPMC do CMC.

5. Literatura

- Armisen R, Gaiatas F (2009) Agar. Phillips GO, Williams PA (red) Handbook of Hydrocolloids 4: 82-107. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition.
- Belaya A, Turea K, Redib M I in. (2008) Measurement of caffeine in coffee beans with UV/vis spectrometer. Food Chemistry 108(1): 310-315.
- Bojarowicz H, Przygoda M (2012) Kofeina cz.I. Powszechność stosowania kofeiny oraz jej działanie na organizm człowieka. Problemy Higieny i Epidemiologii 93: 8-13.
- Brindle LP, Krochta JM (2008) Physical properties of whey protein -hydroxypropylmethylcellulose blend edible films. Journal of Food Science 9(73): 446-454.

- Dworzański W, Szumiło M, Jaskólska A, i in. (2011) Kawa i kofeina - wrogowie czy sprzymierzeńcy kardiologa? *Kardiologia Polska* 69: 173-176.
- Haznar-Garbacz D, Garbacz G (2009) Wybrane aspekty technologii leków o modyfikowanym uwalnianiu. *Farmacja Polska* 65(10): 749-752.
- Kofeina. Karta charakterystyki produktu Sigma-Aldrich (Merck KGaA) dla Polski (dostęp 2017-01-11).
- Mohammadi H, Kamkar A, Misaghi A (2018) Nanocomposite films based on CMC, okra mucilage and ZnO nanoparticles: physico mechanical and antibacterial properties. *Carbohydrate Polymers* 181: 351-357.
- Nelloreb RV, Rekhia GS, Hussain AS i in. (1998) Development of metoprolol tartrate extended-release matrix tablet formulations for regulatory policy consideration. *Journal of Controlled Release* 50: 247-256.
- Pajak P, Fortuna T, Przetaczek-rożnowska i (2013) Opakowania jadalne na bazie białek i polisacharydów - charakterystyka i zastosowanie. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 2 (87): 5-18.
- Shaik MR, Madhuri K, Panati D (2012) Polymers in Controlled Drug Delivery Systems. *International Journal of Pharma Sciences* 2(4): 112-116.
- Szymański Ł, Grabowska B, Kaczmarek K i in. (2015) Celuloza i jej pochodne- zastosowanie w przemyśle. *Archives of Foundry Engineering* 15(4): 129-132.
- Tyliszczak B, Pielichowski K (2007) Charakterystyka matryc hydrożelowych - zastosowanie biomedyczne superabsorbentów polimerowych. *Czasopismo Techniczne* 104: 159-167.

8. Właściwości prozdrowotne i możliwości wykorzystania astaksantyny

Pro-healthy properties and possibilities of application astaxanthin

Katarzyna Łupina

Katedra Biochemii i Chemii Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii,
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,

email: katarzyna.lupina@gmail.com

Słowa kluczowe: przeciwutleniacze, karotenoidy, właściwości przeciwzapalne

Streszczenie

Zagrożenia cywilizacyjne takie jak wzrost skażenia środowiska, występowanie chorób dieto zależnych, wysokie koszty leczenia oraz szybsze starzenie się społeczeństwa spowodowały wzrost zainteresowania żywnością funkcjonalną, która obok dostarczania podstawowych składników żywności stanowi także źródło substancji wykazujących działanie prozdrowotne. Obecnie duża część społeczeństwa zwraca uwagę już nie tylko na wartość kaloryczną produktów, lecz również stara się wprowadzić do swojej diety jak największą ilość substancji aktywnych o potwierdzonym działaniu przeciwutleniającym, przeciwnowotworowym, pro- i prebiotycznym, hepatoprotekcyjnym, itp. Struktura chemiczna i właściwości związków fizjologicznie korzystnych są bardzo zróżnicowane. Spośród wielu związków aktywnych, dużym zainteresowaniem cieszą się karotenoidy. Substancje z tej grupy to barwniki nadające żywności barwę żółtą, pomarańczową oraz czerwoną. Są one naturalnie wytwarzane przez rośliny oraz niektóre bakterie i grzyby. W diecie człowieka uważane są one za jedne z ważniejszych naturalnych przeciwutleniaczy. Znana od dawna astaksantyna, dopiero w ostatnich latach stała się na tyle popularna, że zaczęto wykorzystywać ją w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym. W niniejszej pracy przedstawiono najnowsze doniesienia literaturowe na temat działania astaksantyny i możliwości wykorzystania jej potencjału prozdrowotnego.

1. Wstęp

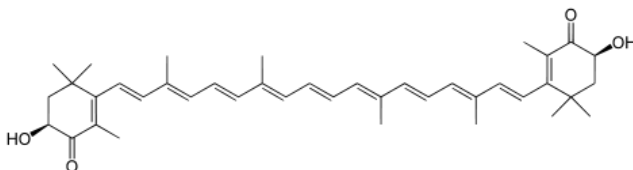
Zanieczyszczenie środowiska i żywności, niewłaściwa dieta i tryb życia oraz coraz szybsze tempo życia codziennego powoduje że nasz organizm coraz częściej narażony jest na stres oksydacyjny. Termin ten opisuje brak równowagi pomiędzy stężeniem reaktywnych form tlenu (ROS) i wolnych rodników, a zdolnością organizmu do detoksykacji i ich usuwania. Większość wolnych rodników oraz ROS jest silnie reaktywna, i jeśli występują w nadmiarze prowadzą do kaskady reakcji, które w konsekwencji powodują uszkodzenia białek, lipidów i DNA. Zmiany tego rodzaju, prowadzą do występowania licznych schorzeń, dlatego wielu naukowców zwraca szczególną uwagę na działanie przeciwutleniaczy, które zmniejszają uszkodzenia oksydacyjne w komórkach organizmu i przeciwdziałają stresowi oksydacyjnemu. Astaksantyna jest popularnym przeciwutleniaczem. Substancja wykazuje zdolność zmiatania wolnych rodników (nadtlenkowego, podchlorynu czy nadtlenoazotynu) oraz wygaszania tlenu singletowego. Dodatkowo astaksantyna może stymulować aktywność enzymów antyoksydacyjnych np. dysmutazy ponadtlenkowej i zmniejszać produkcję ROS. Aktywność przeciwutleniająca astaksantyny jest silniejsza niż działanie witaminy E (o 14 razy), β -karotenu (o 54 razy) oraz witaminy C (o 65 razy). Do tej pory przeprowadzono liczne badania opisujące znaczny potencjał przeciwutleniający astaksantyny oraz skupiające się na innych właściwościach substancji i jej działaniu na organizm człowieka.

2. Opis Zagadnienia

Celem niniejszej pracy jest przegląd i analiza dostępnych danych literaturowych dotyczących właściwości i zastosowania astaksantyny w przemyśle. Przedstawione badania laboratoryjne i kliniczne opisują efekty stosowania astaksantyny we współczesnej medycynie oraz obrazują możliwości jej wykorzystania.

3. Przegląd Piśmiennictwa

Astaksantyna (3,3'-dihydroksy- β,β -karoten-4,4'-dion) (rys.1) należy do grupy ksantofilów i w świecie roślin oraz zwierząt odpowiada za czerwone wybarwienie tkanek. Specyficzna budowa chemiczna astaksantyny sprawia, że wykazuje ona znacznie silniejsze działanie przeciwutleniające oraz większą odporność na działanie wysokiej temperatury i światła, niż pozostałe barwniki tego rodzaju.



Rys. 1. Struktura astaksantyny (Pogorzelska i in. 2016).

Dodatkowo, może szybko i swobodnie przenikać barierę krew-mózg. Obecne w jej strukturze sprzężone wiązania wielokrotne, stanowiące system chromoforowy, odpowiadają za barwę związku oraz jej silne właściwości przeciwutleniające. W porównaniu do innych karotenoidów jest znacznie bardziej stabilna i polarna, ponieważ w swojej strukturze chemicznej posiada po dwie grupy hydroksylowe i karbonylowe. Substancja może występować w formie trzech stereozomerów: (3R,3'R), (3R,3'S) i (3S,3'S). Obecność atomów tlenu w pierścieniach na końcach cząsteczki astaksantyny nadaje im hydrofilowego charakteru. Co więcej, jej struktura chemiczna jest podobna do budowy błony komórkowej dzięki czemu jej działanie nie jest ograniczone, tj. może usuwać wolne rodniki i reaktywne formy tlenu zarówno we wnętrzu błony komórkowej jak i na jej powierzchni (Goto i in. 2001; Stachowiak i Czarnecki 2006; Pogorzelska i in. 2016).

Obecnie astaksantyna wykorzystywana jest w przemyśle spożywczym, nutraceutycznym i farmaceutycznym. Wyróżniamy astaksantynę naturalną i syntetyczną. Tylko niektóre gatunki alg, drożdży, bakterii Gram-ujemnych i roślin są zdolne do biosyntezy tego związku. Zwierzęta wyższe nie są w stanie syntetyzować związku *de novo*, niemniej jednak barwnik jest obecny w ich diecie czego skutkiem jest różowe wybarwienie ich tkanek. Uważa się, że najlepszym źródłem astaksantyny naturalnej są algi *Haematococcus pluvialis*, w przypadku których zawartość barwnika w warunkach optymalnego wzrostu wynosi ok. 3% suchej masy. Duże zapotrzebowanie na naturalną astaksantynę doprowadziło do opracowania innowacyjnych metod opierających się na wprowadzeniu czynników stresogennych do środowiska bytowania alg, dzięki którym efektywność produkcji tej substancji może dochodzić nawet do 4% suchej masy alg. Alternatywnym gatunkiem mikroorganizmów wykorzystywanym do pozyskiwania naturalnej astaksantyny jest *Chlorella zofingensis* oraz drożdże *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Pozyskiwanie związku na skale przemysłową odbywa z pancerzyków skorupiaków. Taka forma otrzymywania astaksantyny z jednej strony nie jest kosztowna, ale z drugiej, ekstrakcja związku odbywa się przy użyciu wysokiej temperatury co prowadzi do rozpadu karotenoidu. Problem ten można rozwiązać poprzez wykorzystanie rozpuszczalników organicznych, co pozwala ekstrahować astaksantynę bez wysokotemperaturowej obróbki, dzięki czemu możliwe jest ograniczenie jej strat (Stachowiak i Czarnecki 2006; Pogorzelska i in. 2016). Na rynku dostępna jest również astaksantyna syntetyczna, do której zalicza się dibursztyniło-disodo-astaksantynę (DDA-*disodium disuccinate astaxanthin*) oraz astaksantynę CDX-085. W odróżnieniu od naturalnych form związku, DDA jest dobrze rozpuszczalna w wodzie co stanowi dużą zaletę. Z kolei, CDX-085 charakteryzuje się większą biodostępnością niż DDA oraz lepszą dyspersją w wodzie. Budowa syntetycznych astaksantyn jest nieco odmienna od substancji uzyskiwanej *de novo* (np. mają inny kształt, przyłączone są do kwasów tłuszczowych) w wyniku czego astaksantyna uzyskiwana syntetycznie może wykazywać słabsze właściwości przeciwutleniające i skutkować odmiennymi efektami działania w przeprowadzanych badaniach klinicznych (Capelli i in. 2013; Sieradzka i Kołodziejczyk-Czepas 2016).

Głównym źródłem naturalnej astaksantyny w diecie człowieka jest mięso ryb (łosoś, leszcz, pstrąg) i owoce morza (krewetki, langusty, kraby), co wynika z faktu, iż substancja ta jest

wykorzystywana w żywieniu ww. zwierząt. Jej zawartość w zależności od zwierzęcia, gatunku i sposobu żywienia może wahać się od 0,28 do 15 mg/100g produktu. Dodatkowym źródłem astaksantyny mogą być suplementy diety. Według alfanumerycznego systemu oznaczeń Unii Europejskiej, astaksantyna została przypisana do grupy barwników i oznaczona symbolem E161j. Podobnie jak inne karotenoidy, astaksantyna ulega przemianom metabolicznym w organizmie człowieka. Związek może występować w postaci wolnej, ale zazwyczaj przyjmuje postać związaną w formie estrów. Metabolizm substancji zaczyna się w nabłonku jelita cienkiego gdzie dochodzi do hydrolizy estrów astaksantyny oraz jej uwolnienia. W kolejnym etapie, astaksantyna tworzy micelle z wolnymi kwasami tłuszczowymi przy udziale kwasów żółciowych. Kolejno na drodze dyfuzji biernej, związek absorbuje do enterocytów dzięki działaniu trzustkowej fosfolipazy A oraz lizofosfatydylocholino. Astaksantyna następnie trafia do chylomikronów i jest wchłaniana do limfy, która transportuje ją do wątroby gdzie łączy się z lipoproteinami. Substancja w największej ilości wiąże się z lipoproteinami o bardzo małej gęstości (VLDL) – od 36 do 64%, w mniejszej ilości z lipoproteinami o małej gęstości (LDL) – 29% oraz wysokiej gęstości (HDL) – 24% (Pogorzelska i in. 2016).

Właściwości astaksantyny i jej wartość prozdrowotna opiera się głównie na jej działaniu przeciwutleniającym. Związek przede wszystkim posiada zdolność zmiatania wolnych rodników. Dane literaturowe potwierdzają, że wykazuje ona znacznie silniejsze działanie w „wychwytywaniu” reaktywnych form tlenu niż inne karotenoidy, tj. α -karoten, β -karoten, luteina czy likopen. Duża efektywność astaksantyny wynika z jej struktury chemicznej. Karotenoidy z natury potrafią wychwytywać tlen singletowy i transportować wzdłuż podwójnego wiązania łańcucha polienowego, tym samym kończąc łańcuch reakcji. Astaksantyna dodatkowo posiada polarne końce, które mogą reagować z głównymi grupami fosfolipidowymi i wymiatać wolne rodniki z powierzchni lub wnętrza warstwy lipidowej (Valko i in. 2007; Rodrigues i in. 2012). Dodatkowo, coraz więcej badań opisuje właściwości przeciwzapalne, przeciwnowotworowe czy immunomodulacyjne astaksantyny. Stosowanie astaksantyny jest bezpieczne i nie wywołuje działań niepożądanych. Zarówno długotrwała suplementacja małymi dawkami astaksantyny (4 mg/ dzień) jak i jednorazowe podanie znacznej dawki związku (100 mg) nie skutkowało wystąpieniem skutków ubocznych (Østerlie i in. 2000; Miyawaki i in. 2008). Również badania na zwierzętach, którym podawano astaksantynę w ilości sięgającej nawet 12 g/kg m.c. nie oddziaływało negatywnie na ich stan zdrowia. Astaksantyna jest stosunkowo szybko usuwana z organizmu, a średni okres jej półtrwania wynosi około 52 dni (Pogorzelska i in. 2016).

Według dostępnych danych literaturowych z ostatnich lat, astaksantyna może stanowić ważny element uzupełniający terapię schorzeń układu krążenia. Niektóre doniesienia oprócz właściwości przeciwutleniających, koncentrują się również na działaniu przeciwzakrzepowym i przeciwzapalnym astaksantyny (Igielska – Kalwat i in. 2015; Sieradzka i Kołodziejczyk-Czepas 2016). Przykładowo, Li i in. (2019) indukowali proces zapalny hepatocytów ryby *Channa argus* z użyciem różnych stężeń lipopolisacharydu. Następnie wykonano testy *in vivo* w których przeprowadzono wstępne leczenie astaksantyną. Otrzymane wyniki pokazały, że związek spełniała istotną rolę przeciwzapalną m.in. regulując cytokiny prozapalne TNF- α , IL-6 i IL-1 β oraz regulując szlaki sygnalizacyjne NF- κ B i kinaz aktywowanych mitogenami (MAPK). Właściwości przeciwzapalne astaksantyny są dopiero poznawane, jednak dotychczas otrzymane wyniki badań sugerują, że może być ona szczególnie ważna w profilaktyce schorzeń układu naczyniowego opierających się na przewlekłym procesie zapalnym, np. w przypadku miażdżycy (Sieradzka i Kołodziejczyk-Czepas 2016).

Z uwagi na coraz częstsze występowanie cukrzycy, niektórzy naukowcy przeprowadzili doświadczenia mające na celu zbadanie wpływu długotrwałego spożywania astaksantyny na metabolizm glukozy. UraKaze i in. (2018) przeprowadzili badanie kliniczne na grupie 29 zdrowych osób, wśród których 16 osób przyjmowało astaksantynę (grupa badawcza), natomiast pozostali placebo (grupa kontrolna). W początkowym etapie badań określono poziom hemoglobiny glikowanej (HbA1c) (wyniki mieściły się w zakresie od 5,6 do 6,4%) oraz przeprowadzono test doustnego obciążenia 75g glukozy (OGTT). Następnie osoby w grupie badanej przez 12 tygodni przyjmowały astaksantynę w ilości 12 mg/dzień. Po upływie tego czasu u wszystkich pacjentów poddanych

suplementacji odnotowano znaczny spadek poziomu HbA1c, jak i poziomu glukozy po ponownym przeprowadzaniu OGTT.

Ograniczenie stresu oksydacyjnego ma duże znaczenie w przypadku schorzeń neurodegeneracyjnych i wiele prac naukowych wskazuje, że astaksantyna może odgrywać kluczową rolę przy profilaktyce i leczeniu chorób takich jak Alzheimer czy Parkinson (Fakhri i in. 2019). Opierając się na tej hipotezie, przeprowadzono badania dotyczące wpływu suplementacji astaksantyną na stan psychiczny i nastrój osób zdrowych. W eksperymencie wzięło udział 28 osób, z medianą wieku 42 lata, którzy przyjmowali 12 mg astaksantyny (grupa badana) lub placebo (grupa kontrolna). Przed dniem 0 i ponownie na końcu 8-tygodniowego okresu suplementacji, badani wypełnili ankietę w celu oceny nastroju. Ostatecznie wyniki ankiety pokazały, że w grupie poddanej suplementacji znacznie poprawił się ogólny stan nastroju (+11%) oraz korzystniej wypadły parametry warunkujące depresję (o 57%) i zmęczenie (o 36%). Otrzymane wyniki sugerują że oprócz poprawy mierzonych parametrów związanych ze zdrowiem mózgu (schorzenia neurologiczne i funkcje poznawcze), suplementacja astaksantyną zmniejszyła negatywne cechy nastroju jednocześnie wspierając samopoczucie psychiczne (Talbot i in. 2019).

Inne dostępne dane literaturowe potwierdzają również, że astaksantyna przeciwdziała procesom starzenia się skóry redukując zmarszczki, plamy, piegi oraz działa ochronnie przeciwko promieniowaniu UV. Co więcej, astaksantyna może przeciwdziałać nowotworom powodując ich apoptozę, zwiększa siłę mięśni oraz przyspiesza ich regenerację, działa ochronnie na żołądek w przypadku zakażenia *Helicobacter pylorii*, a także działa ochronnie na oczy i stawy (Igielska – Kalwat i in. 2015).

Obecnie astaksantyna jest stosowana przede wszystkim jako pigment w akwakulturze. Barwnik dodawany jest do pasz ryb oraz owoców morza w wyniku czego ich mięso przyjmuje intensywniejszą barwę różowo-czerwoną, co skutkuje lepszą jakością oraz większą akceptacją na rynku konsumenckim. Dodatek astaksantyny wpływa również pozytywnie na rozwój akwakultury, ponieważ poprawia płodność zwierząt wodnych. Karotenoid stanowi również popularny element pasz dla drobiu i świń w celu nadania intensywniejszej barwy mięśniom zwierząt oraz żółtkom jaj kur (Pogorzelska i in. 2016; Lim i in. 2018).

Badania nad prozdrowotnymi właściwościami astaksantyny pozwoliły dostrzec jej potencjał, dlatego obecnie substancja jest dostępna w formie suplementów diety. Swoje zastosowanie znalazła również w przemyśle spożywczym. Dotychczas była wykorzystana jako element funkcjonalnego oleju słonecznikowego, który odpowiada za hamowanie utleniania kwasów tłuszczowych w produkcji. Zainteresowanie astaksantyną jest duże, jednak istnieją pewne problemy z jej wykorzystaniem w branży spożywczej na skalę przemysłową. Biodostępność astaksantyny jest ograniczona, ponieważ związek jest niestabilny chemicznie, co znacznie ogranicza możliwości wykorzystania astaksantyny jako funkcjonalnego składnika żywności. Dodatkowo naturalna astaksantyna jest słabo rozpuszczalna w wodzie, co również może ograniczać jej biodostępność. W środowisku naturalnym astaksantyna występuje w postaci estrów, dlatego konieczne jest przeprowadzenie hydrolizy przez esterazy cholesterolowe, aby doszło do jej uwolnienia. Stopień absorpcji substancji zależy w dużej mierze od czynników żywieniowych, np. obecności tłuszczu w pokarmie. Powyższe ograniczenia sprawiły, że konieczne stało się prowadzenie badań mających na celu opracowanie metod umożliwiających poprawienie stabilności astaksantyny oraz jej biodostępności (Sieradzka i Kołodziejczyk-Czepas 2016; Liam i in. 2018).

Z jednej strony rozwiązaniem problemu, może być włączenie astaksantyny do preparatów zawierających zwiększoną ilość tłuszczu lub wytworzenie emulsji, z drugiej substancję można osadzić w nośnikach umożliwiających jej lepszą rozpuszczalność w wodzie oraz zwiększających stabilność związku. Nowe perspektywy dla przyszłego zastosowania astaksantyny w produkcji żywności funkcjonalnej daje wytworzenie nanoemulsji. Mao i in. (2019) wytwarzali nanoemulsje na bazie trójglicerydu kaprylowo-kaprynowego, glicerynomonosterynianu, surfaktantu (Tween 60) oraz 98% astaksantyny. Ciekłe nośniki pozwoliły zapewnić dobrą stabilność astaksantyny przez całe 28 dni badania w temperaturze 25°C. Dodatkowo przeprowadzono trawienie *in vitro* otrzymanych nośników, którego wyniki sugerowały że nanoemulsje mogą stanowić potencjalną formę doustnego dostarczania astaksantyny, ponieważ zapewniają dobrą strawność substancji. Inne badanie skupiało

się nad fotostabilizacją pigmentu, przy użyciu oleistej nanoemulsji stabilizowanej fosfolipidami, nanoemulsji z chitozaniem, nanoemulsji stabilizowanych karageniną, alginianem wapnia i tripolifosforanem chitozanu. Nośniki były łatwe w przygotowaniu, wykluczono wysokotemperaturową obróbkę oraz wykorzystanie toksycznych odczynników, dlatego systemy mogą stanowić dobrą bazę do tworzenia żywności dla zwierząt i ludzi zawierającą astaksantynę. Najlepsze efekty fotostabilizacji uzyskano w przypadku nośników z karageniną (Aларcon-Aларcon 2018).

4. Podsumowanie i Wnioski

Przedstawione dane literaturowe wskazują, że astaksantyna może stanowić ważny element w profilaktyce i leczeniu wielu schorzeń. Badania kliniczne dostarczają nowych perspektyw dotyczących jej wykorzystania zarówno w przemyśle farmaceutycznym jak i innych dziedzinach życia. Oprócz udowodnionego działania przeciwutleniającego, substancja ta może wykazywać również właściwości przeciwzapalne, przeciwnowotworowe, czy hamujące procesy neurodegeneracyjne. Bazując na dostępnej wiedzy codzienna suplementacja astaksantyną wydaje się uzasadniona również w przypadku osób zdrowych. Badania pilotażowe sugerują, że związek może w przyszłości stanowić popularny składnik żywności funkcjonalnej. Jednak, aby upowszechnić wykorzystanie astaksantyny w przemyśle spożywczym wymagane jest przeprowadzenie większej ilości oznaczeń w celu opracowania metod pozwalających uzyskać nośniki umożliwiające zachowanie stabilności i poprawy biodostępności astaksantyny.

5. Literatura

- Alarcon-Alarc C, Inostroza-Riquelme M, Torres-Gallegos C i in. (2018) Protection of astaxanthin from photodegradation by its inclusion in hierarchically assembled nano and microstructures with potential as food. *Food Hydrocolloids* 83:36-44.
- Capelli B, Bagchi D, Cysewski GR (2013) Synthetic astaxanthin is significantly inferior to algal-based astaxanthin as an antioxidant and may not be suitable as a human nutraceutical supplement. *Nutrafoods* 12(4): 145-152.
- Fakhri S, Aneva IY, Farzaei MH i in. (2019) The neuroprotective effects of astaxanthin: therapeutic targets and clinical perspective. *Molecules* 24: 1-19.
- Goto S, Kogure K, Abe K i in. (2001) Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1512(2): 251-258.
- Igielska-Kalwat J, Gościańska J, Nowak I (2015) Karotenoidy jako naturalne antyoksydanty. *Problemy Higieny i Epidemiologii* 69: 418-428.
- Lim KC, Yusoff F, Shariff M (2018) Astaxanthin as feed supplement in aquatic animals. *Reviews in Aquaculture* 10: 738-773.
- Li M, Sun L, Niu X (2019) Astaxanthin protects lipopolysaccharide-induced inflammatory response in *Channa argus* through inhibiting NF- κ B and MAPKs signaling pathways. *Fish & Shellfish Immunology* 86: 280-286.
- Mao X, Tian Y, Sun R i in. (2019) Stability study and in vitro evaluation of astaxanthin nanostructured lipid carriers in food industry. *Integrated ferroelectrics* 200: 208-216.
- Miyawaki H, Takahashi J, Tsukahara H i in. (2008) Effects of astaxanthin on human blood rheology. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 43(2): 69-74.
- Østerlie M, Bjerckeng B, Liaaen-Jensen S (2000) Plasma appearance and distribution of astaxanthin E/Z and R/S isomers in plasma lipoproteins of men after single dose administration of astaxanthin. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 11(10): 482-490.
- Pogorzelska E, Hamułka J, Wawrzyniak A (2016) Astaksantyna - budowa, właściwości i możliwości zastosowania w żywności funkcjonalnej. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.* 1(104): 5-16

- Rodrigues E, Mariutti LRB, Mercadante AZ (2012) Scavenging Capacity of Marine Carotenoids against Reactive Oxygen and Nitrogen Species in a Membrane-Mimicking System. *Marine Drugs* 10(8): 1784-1798.
- Sieradzka M, Kołodziejczyk-Czepas J (2016) Astaksantyna - karotenoidowy przeciwutleniacz o właściwościach kardioprotekcyjnych. *Problemy Higieny i Epidemiologii* 97(3): 197-206.
- Stachowiak B, Czarnecki Z (2006) Drożdże *Phaffia rhodozyma* jako potencjalne źródło naturalnej astaksantyny. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.* 2(47): 17-28.
- Talbott S, Hantla D, Capelli B i in. (2019) Astaxanthin supplementation reduces depression and fatigue in healthy subjects. *EC Nutrition* 14.3: 239-246.
- Urakaze, Kobashi, Satou i in. (2018) Clinical study of astaxanthin on glucose tolerance in nondiabetic subjects. *Diabetes* 67: 766.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J i in. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39(1): 44-84.

9. Usuwanie barwników z roztworów wodnych w procesie wymiany jonowej

Dyes removal from aqueous solutions using ion-exchange

Polska-Adach Ewelina

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Wydział Chemii, Instytut Nauk Chemicznych, Katedra Chemii Nieorganicznej, pl. M. Curie-Skłodowskiej 2, 20-031 Lublin

Opiekun naukowy: dr hab. Monika Wawrzekiewicz

Ewelina Polska-Adach: ewelinapolskaadach@gmail.com

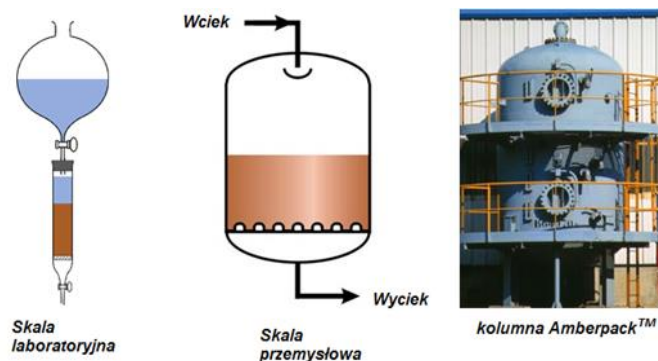
Słowa Kluczowe: żywicie jonowymienne, barwniki

Streszczenie

W pracy został omówiony proces wymiany jonowej oraz podział jonitów. Opisano także czynniki wpływające na szybkość wymiany jonów oraz własności jonitów w obecności roztworów elektrolitów. Ponadto porównano efektywność sorbentów t.j. żywicie jonowymiennych, węgla aktywnych, sorbentów typu „low cost” oraz zeolitów w procesach usuwania barwników z roztworów wodnych pod kątem ich praktycznego zastosowania w procesie oczyszczania ścieków przemysłu włókienniczego. Szczególną uwagę skupiono na porównaniu wartości pojemności sorpcyjnej ww. sorbentów względem barwników oraz możliwość desorpcji zaadsorbowanych barwników.

1. Wstęp

Wymiana jonowa jest procesem wymiany jonów pomiędzy roztworem, a jonitem o tym samym znaku i w ilościach równoważnych. Jonity zwane również żywicami jonowymiennymi są praktycznie nie rozpuszczalne w roztworze i są zdolne do wymiany jonów, gdyż zawierają grupy jonogenne. Grupy te są trwale związane z jonitem oraz są zjonizowane lub zdolne do dysocjacji. Po wprowadzeniu żywicy jonowymiennnej do roztworu elektrolitu zachodzi wymiana jonów aż do momentu ustalenia się stanu równowagi. Roztwór będący w stanie równowagi zawiera te same jony co początkowo, natomiast w zmienionym stężeniu, a także jony związane początkowo z jonitem. Proces wymiany jonowej realizowany jest najczęściej w układzie kolumnowym (Rys.1).



Rys. 1. Proces wymiany jonowej prowadzony na skalę laboratoryjną oraz przemysłową w układzie kolumnowym.

Wykorzystywany jest on m.in. do: odsalania, zmiękczenia, demineralizacji, usuwania fosforanów, azotanów oraz zanieczyszczeń organicznych z wody, wyodrębniania i odzyskiwania składników z roztworów rozcieńczonych, do przeróbki roztworów otrzymanych z hydrometalurgicznego procesu przerobu rud oraz oczyszczania ścieków. Spośród wszystkich wymienionych zastosowań w głównej mierze jest wykorzystywany w procesie demineralizacji wody. Różnego rodzaju substancje organiczne zawarte w ściekach posiadają odmienne właściwościami

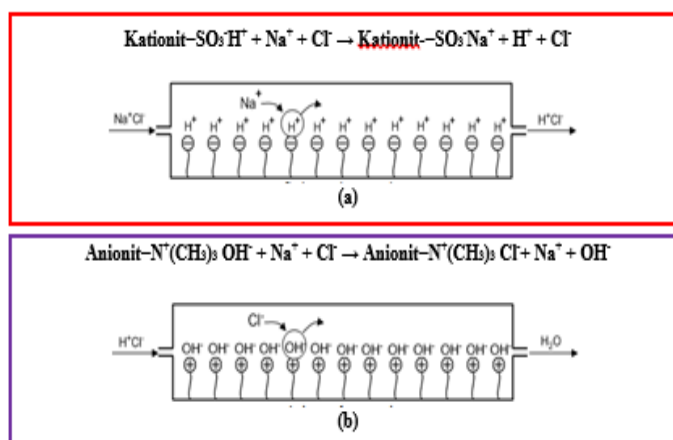
w związku z tym możliwe są dwa mechanizmy ich usuwania przy wykorzystaniu żywic jonowymiennych:

- wymiana jonowa czyli proces wymiany jonów między roztworem, a jonitem o tym samym znaku i w ilościach równoważnych. Proces ten uwarunkowany jest występowaniem oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy grupami funkcyjnymi żywicy i grupami funkcyjnymi makrocząsteczek organicznych;
- fizyczna adsorpcja, która jest rezultatem występowania sił van der Waalsa pomiędzy hydrofobowymi centrami makrocząsteczek organicznych (m.in. barwników) i matrycą polimeru (Tan i Kilduff 2007).

Sam proces wymiany jonowej przebiega w następujących etapach:

- I początkowo zachodzi przemieszczanie się jonu z głębi roztworu do powierzchni jonitu
- II następnie jon dyfunduje wewnątrz ziarna jonitu do grupy jonogennej
- III w kolejnym etapie dochodzi do reakcji wymiany
- IV wymieniony jon przemieszcza się z wewnątrz ziarna do jego powierzchni
- V wymieniony jon przemieszcza się z powierzchni jonitu do roztworu

Proces wymiany jonowej przedstawiono na Rys. 2:



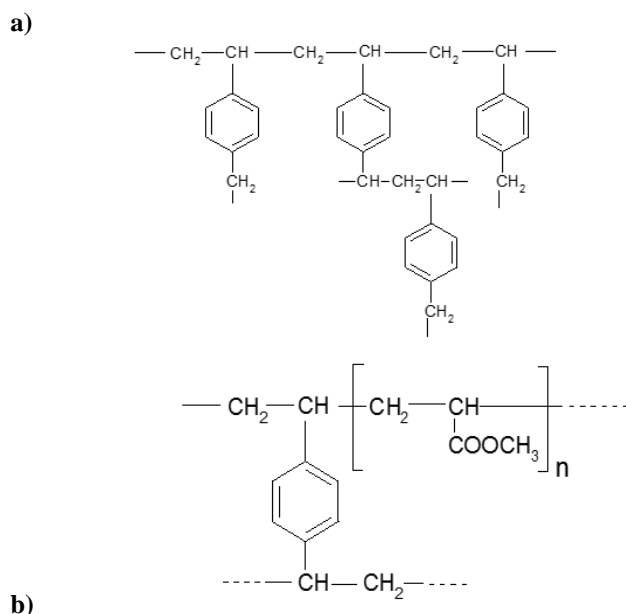
Rys. 2. Mechanizm wymiany kationowej (a) i anionowej (b).

Szybkość procesu wymiany jonowej jest uwarunkowana budową jonitu (wielkość porów), rodzajem i ilością grup funkcyjnych, wielkością ładunku elektrycznego jonów biorących udział w procesie wymiany, stężenie elektrolitu, pH roztworu, rodzajem zanieczyszczeń obecnych w roztworze, temperaturą procesu.

2. Opis zagadnienia

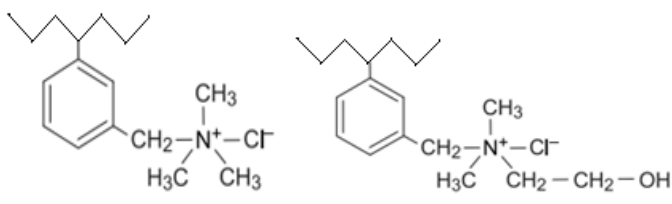
Intensywny rozwój metod opierających się na wymianie jonowej, a także wzrost zakresu ich wykorzystania i stosowania nastąpił w momencie wynalezienia jonitów charakteryzujących się odpowiednimi właściwościami fizykochemicznymi. Powszechnie wykorzystywane w technologii oczyszczania roztworów wodnych i ścieków żywice jonowymiennne (jonity) są ciałami stałymi, wielkocząsteczkowymi, nierozpuszczalnymi w wodzie i rozpuszczalnikach organicznych. Charakteryzują się one dużą zdolnością wymienną, dobrą odpornością chemiczną oraz dużą wytrzymałością mechaniczną. Podstawowym parametrem charakteryzującym jonit jest jego zdolność wymienna, oznaczająca ilość jonów, które mogą zostać wymienione z roztworem w przeliczeniu na jeden gram suchego jonitu lub 1 cm³ spęczniałej żywicy jonowymiennnej (Floriańczyk i Penczek 1998). Każda żywica jonowymienna zbudowana jest z:

- matrycy np. polistyrenowej, poliakrylowej, fenolowo – formaldehydowej (Rys.3)



Rys. 3. Matryce jonitów: styrenowo-diwinylobenzenowa (a) i akrylowo-diwinylobenzenowa (b).

- grupy funkcyjnej: o charakterze kationu: (np. czwartorzędowa amoniowa, trzeciorzędowa aminowa, fosfoniowa, sulfoniowa lub grupy funkcyjne o charakterze anionu: (np. sulfonowa, karboksylowa, aminodwuocianowa, fosfonowa, fosfinowa) (Rys.4)



Rys. 4. Rodzaje grup funkcyjnych anionitów.

- przeciwjonu.

Wymieniacze jonowe możemy podzielić ze względu na

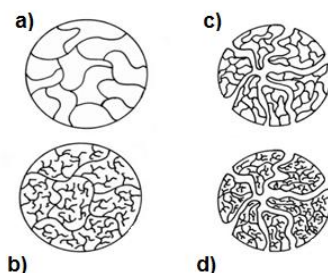
a) stopień dysocjacji grup funkcyjnych (Kowal i Ewiderska-Bróz 1996, Nawrocki i Biłozor 2000):

- kationity obojętne lub słabo kwaśne posiadające słabo zdysocjowane grupy funkcyjne, które mogą wymieniać tylko kationy pochodzące z soli słabych kwasów; efektywne w obojętnym lub słabo alkalicznym środowisku; mają one strukturę porowatą
- kationity silnie kwaśne z silnie zdysocjowanymi grupami funkcyjnymi, zdolnymi do wymiany wszystkich kationów, skuteczne w szerokim zakresie pH; mogą mieć strukturę żelu lub makroporowatą, ich matrycę stanowi zazwyczaj żywica styrenowa usieciowana diwinylobenzenem; kationity silnie kwaśne posiadają grupy funkcyjne typu mocnych kwasów (-SO₃H) lub ich soli (-SO₃Na)
- anionity słabo zasadowe mające słabo zdysocjowane grupy funkcyjne (np. pierwszorzędowe, drugorzędowe i trzeciorzędowe amoniowe), wymieniające tylko aniony mocnych kwasów; ich struktura jest makroporowata lub żelowa

- aniony silnie zasadowe z silnie zdysocjowanymi grupami funkcyjnymi np. $-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$ lub $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})^+$, które mogą wymieniać aniony nawet bardzo słabych kwasów mają strukturę żelową lub makroporowatą. Aniony tego typu mogą być stosowane bez względu na odczyn roztworu, ponieważ występują w postaci zdysocjowanej w całym zakresie pH.
- b) pochodzenie:
- naturalne np. zeolity czyli uwodnione glinokrzemiany sodowe lub wapniowe, które obecnie wychodzą z użytku ze względu na ich gorsze właściwości fizykochemiczne w porównaniu z jonitami syntetycznymi. Naturalne wymiennicze jonowe, w tym i zeolity nie są odporne na działanie kwasów, pod których wpływem następuje ich rozkład.
 - półsyntetyczne pochodzenia naturalnego, poddane przemianom chemicznym np. węgle sulfonowane. Otrzymywane są w wyniku sulfonowania węgla kamiennego stężonym kwasem siarkowym (VI). Ta częściowa obróbka chemiczna powoduje podniesienie ich zdolności wymiennej przez zastąpienie substancji przeszkadzających, dodatkowymi, czynnymi grupami funkcyjnymi.
 - syntetyczne np. syntetyczne glinokrzemiany lub syntetyczne żywice organiczne. Otrzymywane są zwykle na drodze syntezy organicznej przez polimeryzację lub polikondensację. Są to substancje nierozpuszczalne w wodzie oraz innych rozpuszczalnikach organicznych, posiadają wysoką zdolność wymienną, wysoką trwałość mechaniczną i chemiczną dzięki czemu znajdują szerokie zastosowanie w przemyśle.
- c) Skład matrycy (szkieletu) i jej strukturę
- organiczne- wśród tej grupy najbardziej rozpowszechnione są syntetyczne wymiennicze organiczne. Są one żelami wielkocząsteczkowego, usieciowanego polimeru. Ich wysoka trwałość mechaniczna oraz chemiczna, wysoka zdolność wymienna sprawia, że są one lepsze od pozostałych wymienniczy jonowych.
 - nieorganiczne są to naturalnie występujące w przyrodzie np. gliny, zeolity oraz materiały syntetyczne (Minczewski i in. 1973).

Uwzględniając strukturę przestrzenną żywic jonowymiennych można je sklasyfikować na żelowe i makroporowate. Ich podstawowa struktura jest identyczna: struktura makrocząsteczkowa jest uzyskiwana w obu przypadkach w procesie polimeryzacji jako tzw. kopolimery żelowe, których właściwości transportowe, wynikające z podatności na proces dyfuzji wewnątrzziarnowej, uzależnione były od wielkości pozornych porów polimerycznego szkieletu powstających między łańcuchami polimeru i wiązaniami sieciującymi. Różnica między tymi dwoma typami żywic odnosi się do ich porowatości. Żywica typu żel posiada naturalną porowatość ograniczoną do odległości między cząsteczkami. Jest to struktura typu mikroporowatego. Średnica porów żywicy żelowej wynosi $2\div 3$ nm (Zagorodni 2007) i zależy od stopnia usieciowania kopolimeru i zawartości grup hydrofilowych. Natomiast żywice typu makroporowatego posiadają dodatkową sztucznie wytworzoną porowatość, która jest osiągnięta poprzez dodatek substancji przeznaczonych do tego właśnie celu na etapie polimeryzacji. Średnice porów żywic makroporowatych są dość duże (do 150 nm), po to aby następowała szybka dyfuzja wewnątrzziarnowa do grup jonogennych (Nawrocki 2010). Cechą charakterystyczną tego typu żywic jest możliwość wymiany jonów o bardzo dużych rozmiarach np. makroanionów organicznych. Posiadają one dużo większą powierzchnię właściwą w porównaniu do żywic żelowych.

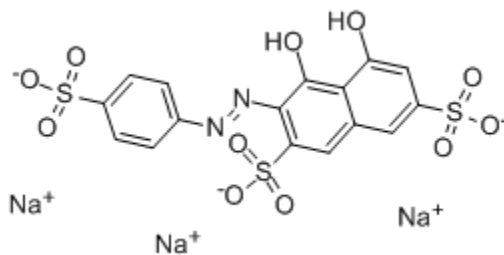
Wybór odpowiedniej żywicy jonowymiennnej uwzględniający jej wewnętrzną strukturę jest bardzo ważny podczas wykorzystania jej do konkretnego celu (Rys.5). Żywice makroporowate posiadające dużą powierzchnię właściwą, umożliwiają szybki i łatwy proces wymiany jonów o dużych rozmiarach. Z kolei w żywicach mikroporowatych wymieniane jony dyfundują przez strukturę żelu do poszczególnych centrów wymiennych. W jonitach mikroporowatych wszystkie grupy funkcyjne są dostępne dla wymiany pod warunkiem, że jony wymieniane nie posiadają zbyt dużych rozmiarów.



Rys. 5. Schemat budowy żywicy żelowej (a), żelowej-rozgałęzionej (b), porowatej (c) i porowatej-rozgałęzionej (d).

3. Przegląd literatury

Jonity polimeryzacyjne cechuje: duża zdolność wymienna, dobra odporność chemiczna oraz duża wytrzymałość mechaniczna w porównaniu do jonitów polikondensacyjnych dzięki czemu stanowią one obecnie przeważającą część światowej produkcji przemysłowej. Co więcej dzięki wprowadzeniu do produkcji przemysłowej jonitów makroporowatych, o rzeczywistych wymiarach porów większych niż wymiary cząsteczkowe, udało się uzyskać poprawę zdolności kinetycznych stosowanych wymiennaczy jonowych (Dąbrowski 2006). Do usunięcia barwnika SPADNS (Rys.6) Greluk i Hubicki (Greluk i Hubicki 2011) wykorzystali anionity makroporowate o matrycy polistyrenowej (Amberlyst A-21 i Amberlyst A-29) różniące się między sobą zasadowością grupy funkcyjnej. Uwzględniono wpływ początkowego stężenia barwnika i czasu kontaktu fazowego w celu oceny zdolności sorpcyjnej wymiennaczy anionowych. Dane równowagowe zostały wyliczone w oparciu o różne modele izoterm adsorpcji, w tym Langmuira, Freundlicha i Dubinina-Radushkevicha. Stałe szybkości reakcji wymiany obliczono stosując model pseudo-pierwszego rzędu, pseudo-drugiego rzędu oraz dyfuzji międzyziarnowej Morrisa-Webera. Wyniki wykazały, że adsorpcja barwników w stanie równowagi jest zgodna z równaniem Langmuira, a kinetykę retencji SPADNS na obu wymiennaczach anionowych można najlepiej opisać za pomocą modelu pseudo-drugiego rzędu. Największą pojemność sorpcyjną podczas adsorpcji SPADNS uzyskano stosując silnie zasadowy Amberlyst A-29 i wynosiła ona 387,7 mg/g, natomiast dla słabo zasadowego Amberlyst A-21 wartość ta była praktycznie o połowę niższa i wynosiła 187,6 mg/g.



M = 570.4 g/mol CAS: 23647-14-5

Rys. 6. Wzór strukturalny SPANDS.

Interesujące są również badania Wawrzekiewicz i Hubickiego (Wawrzekiewicz i Hubicki 2008), którzy do usunięcia C.I. Acid Blue 74 wykorzystali anionity żelowe Amberlite IRA-67 i Amberlite IRA-402 różniące się między sobą grupami funkcyjnymi oraz matrycą. Podczas sorpcji barwnika C.I. Acid Blue 74 na wykorzystanych anionitach stwierdzono, że wraz ze wzrostem temp. 293-328K ilość substancji zaadsorbowanej rośnie. Pojemność sorpcyjna użytych anionitów wynosiła 46,6 mg/g i 79,3 mg/g kolejno dla Amberlite IRA-67 i Amberlite IRA-402.

Warto także wspomnieć o badaniach mających na celu usunięcie barwnika bezpośredniego C.I. Direct Blue 71 na anionicie Lewatit MonoPlus SR-7. Pojemność sorpcyjna anionitu względem

C.I. Direct Blue 71 wynosiła 850,2 mg/g. Dodatek soli t.j: Na_2CO_3 oraz Na_2SO_4 w zakresie od 5 do 25 g/dm³ do roztworów zawierających w/w barwnik w ilości 100 mg/dm³ spowodował wzrost pojemności sorpcyjnej. Ilości barwnika bezpośredniego zaadsorbowanego przez anionit w stanie równowagi (q_e) z roztworów o stężeniu wyjściowym adsorbentu 100-1000 mg/dm³ są zbliżone do tych wartości, które zostały obliczone z równania kinetycznego pseudo-drugiego rzędu, co potwierdza wartości współczynników determinacji r^2 . Brak wyraźnego wpływu pH roztworu na retencję barwnika oraz niezadowalająca jego desorpcja z fazy anionitu (wydajność desorpcji 12,1 %, eluent: 1 M NaOH w 90% v/v metanolu) wskazują, że proces jego wiązania ma charakter mieszany z dominującym udziałem chemisorpcji (Wawrzkiwicz i in. 2017).

W ciągu ostatnich lat podjęto próby poszukiwania nowych, a zarazem tanich sorbentów wykorzystywanych w procesach sorpcji różnych substancji, jonów metali ciężkich, a także barwników ze ścieków. Istotą tego problemu jest zastąpienie drogich tradycyjnych sorbentów tanimi, które często są produkowane z materiałów odpadowych (z ang. low-cost). Niektóre z nich powstają z odpadów, które nie znajdują już żadnego zastosowania, zaliczamy do nich m. in. łuski ryżowe, słoma czosnkowa, skórki, pestki owoców cytrusowych, odpady rolnicze, popioły lotne, torf oraz wiele innych (Rafatullah 2010).

Hameed i in. (Hameed 2008) zbadali zdolności sorpcyjne adsorbentu przygotowanego z odpadów kokosowych (CBW) i odpadów rolniczych do usuwania zasadowego barwnika (błękitu metylenowego) z roztworu wodnego. Eksperymenty prowadzono w temp. 303K w celu zbadania wpływu pH i początkowego stężenia błękitu metylenowego (MB). Wyzaczyli izotermy adsorpcji w oparciu o modele Langmuira, Freundlicha i Temkina. Uzyskane wyniki były zgodne z modelem izotermy Langmuira, pojemność monowarstwy wynosiła 70,92 mg/g w temp. 303K. Kinetyka sorpcji została opisana przy użyciu równania pseudo-pierwszego rzędu, pseudo-drugiego rzędu i równania dyfuzji wewnątrzcząsteczkowej. Dane eksperymentalne bardzo dobrze opisywał model równania kinetycznego pseudo-drugiego rzędu.

Nasiona papai, które są powszechnie dostępnym produktem odpadowym w Malezji zostały wykorzystane do usunięcia błękitu metylenowego. Przeprowadzone badania miały na celu zbadanie wpływu czasu kontaktu, początkowego stężenia barwnika (50–360 mg/dm³) i pH (3–10) na usuwanie błękitu metylenowego (MB) w temperaturze 303K. Maksymalna zdolności adsorpcji wynosiła 555,56 mg/g. Kinetyka procesu sorpcji zachodziła zgodnie z równaniem pseudo-drugiego rzędu. Uzyskane wyniki badań wykazały, że nasiona papai są bardzo skuteczne w usuwaniu błękitu metylenowego z roztworów wodnych (Hameed 2009).

Na uwagę zasługują również węgle aktywne (materiały węglowe), które otrzymywane są głównie z surowca organicznego, takiego jak torf, antracyt, drewno, trociny, węgiel brunatny czy też kamienny, a także z substancji pochodzenia zwierzęcego np. kości. Węgłe otrzymywane ze skorup orzechów oraz pestek owoców charakteryzują się znaczną wytrzymałością. Materiały węglowe charakteryzują się dużą powierzchnią właściwą (300 – 2500 m²/g), silnie rozwiniętą strukturą porowatą (mikropory, mezporoy) oraz możliwością modyfikacji powierzchni. Ww. cechy przyczyniły się do zastosowania węgla aktywnego w procesach usuwania barwników ze ścieków. Węgiel aktywny zastosowano do usuwania barwników reaktywnych. Órfão i współpr. (Órfão 2006) zbadali zdolności sorpcyjne węgla względem C.I. Reactive Red 241. Maksymalna pojemność adsorpcji wyznaczona w temp. 298 K i dla różnych próbek węgla zmieniała się w kolejności ACa (lekko kwasowe) < ACo (normalne) < ACb (lekko zasadowe), największe wartości uzyskano w pH=2. Proces ten można wytłumaczyć wzrostem zasadowości próbek z ACa do ACb. Kinetykę adsorpcji na trzech rozpatrywanych próbkach węgla opisywano modelem pseudo-drugiego rzędu. Wielościenne nanorurki węglowe i sproszkowany węgiel aktywny zostały wykorzystane przez Prola i in. (Prola 2013) jako potencjalne adsorbenty do usuwania C.I. Direct Blue 53 z roztworów wodnych. Przy pH 2,0 optymalna adsorpcja barwnika została osiągnięta przez oba adsorbenty. Stan równowagi został osiągnięty po 3 i 4 h odpowiednio stosując nanorurki węglowe i sproszkowany węgiel. Maksymalna pojemność sorpcyjna adsorpcji barwnika wynosiła 409,4 i 135,2 mg/g odpowiednio dla nanorurek węglowych i sproszkowanego węgla. Przeprowadzone badania wykazały, że nanorurki węglowe wraz z zaadsorbowanym barwnikiem C.I. Direct Blue 53 można regenerować przy użyciu mieszaniny 50% acetonu + 3 mol/dm³ NaOH. Węgłe aktywne są substancjami nietoksycznymi i łatwymi do utylizacji

po zużyciu, dlatego też odgrywają dosyć ważną rolę w procesach oczyszczania ścieków, natomiast ze względu na wysoką cenę ich wykorzystanie jest ograniczone.

4. Podsumowanie

Wymiana jonowa już od dawna posiada stabilne i ważne miejsce w technologii oczyszczania ścieków. Wiąże się to m.in. z upowszechnieniem metod wykorzystujących różnego typu żywice jonowymienne, bez których obecnie ciężko byłoby się obejść w wielu dziedzinach przemysłu chemicznego (Bogoczek i Surowiec 1978). Jak pokazuje przedstawiony przegląd literaturowy jonity różnego typu jako adsorbenty barwników wykazują bardzo dobre właściwości sorpcyjne. W porównaniu z innymi adsorbentami jonity mogą znaleźć praktyczne zastosowanie w procesach sorpcji barwników z roztworów wodnych i ścieków.

5. Literatura

- Bogoczek R, Surowiec J (1978) Obecny stan rozwoju wymiennicy jonowych. *Przemysł Chemiczny* 57: 51-56.
- Dąbrowski A, Hubicki Z, Podkościelny P i in. (2006) Selective removal of heavy metal ions from industrial wastewaters by ion-exchange. *Przemysł Chemiczny* 85: 232-241.
- Floriańczyk Z, Penczek S (1998) *Chemia polimerów. T. III.* Warszawa: Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej: 254-265.
- Greluk M, Hubicki Z (2009) Sorption of SPADNS azo dye on polystyrene anion exchangers: equilibrium and kinetic studies. *Journal of hazardous materials* 172: 289-297
- Hameed BH, Mahmoud DK, Ahmad AL (2008) Equilibrium modeling and kinetic studies on the adsorption of basic dye by a low-cost adsorbent: Coconut (*Cocos nucifera*) bunch waste. *Journal of Hazardous Materials* 158: 65-72.
- Hameed BH (2009) Evaluation of papaya seeds as a novel non-conventional low-cost adsorbent for removal of methylene blue. *Journal of Hazardous Materials* 162: 939-944.
- Kowal AL, Ewidarska-Bróz M (1996) *Oczyszczanie wody.* Warszawa – Wrocław, PWN.
- Minczewski J, Chwastowska J, Dybczyński R (1973) *Analiza śladowa. Metody rozdzielania i zagęszczania.* WNT Warszawa: rozdział 5.
- Nawrocki J, Biłozor S (2000) *Uzdatnianie wody. Procesy chemiczne i biologiczne.* PWN Warszawa.
- Nawrocki J (2010) *Uzdatnianie wody. Procesy fizyczne, chemiczne i biologiczne.* Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa.
- Órfão JJM, Silva AIM, Pereira JCV et al. (2006) Adsorption of a reactive dye on chemically modified activated carbons—Influence of pH. *Journal of Colloid and Interface Science* 296: 480 – 489.
- Prola LDT, Machado FM, Bergmann CP et al. (2013) Adsorption of Direct Blue 53 dye from aqueous solutions by multi-walled carbon nanotubes and activated carbon. *Journal of Environmental Management* 130: 166 – 175.
- Rafatullah M, Sulaiman O, Hashim R et al. (2010) Adsorption of methylene blue on low-cost adsorbents: a review. *Journal of Hazardous Materials* 177: 70-80.
- Tan J, Kilduff JE (2007) Factors affecting selectivity during dissolved organic matter removal by anion-exchange resins. *Water Research* 41: 4211-4221.
- Wawrzkiwicz M, Hubicki Z (2008) Zastosowanie anionitów słabo i silnie zasadowych w procesie usuwania indygo-karminu z roztworów wodnych. *Przemysł Chemiczny* 87: 711-714.
- Wawrzkiwicz M, Hubicki Z, Polska-Adach E (2017) Strongly basic anion exchanger Lewatit MonoPlus SR-7 for acid, reactive, and direct dyes removal from wastewaters. *Separation Science and Technology* 53: 1065-1075.
- Zagrodni AA (2007) *Ion Exchange materials. Properties and applications.* Elsevier.

10. Sorpcja barwników kwasowych, bezpośrednich i reaktywnych z roztworów wodnych przy wykorzystaniu sorbentów różnego typu

Sorption of acid, direct and reactive dyes from aqueous solutions using various types of sorbents

Polska-Adach Ewelina

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Wydział Chemii, Instytut Nauk Chemicznych,
Katedra Chemii Nieorganicznej, pl. M. Curie-Skłodowskiej 2, 20-031 Lublin
Opiekun naukowy: dr hab. Monika Wawrzekiewicz

Ewelina Polska-Adach: ewelinapolskaadach@gmail.com

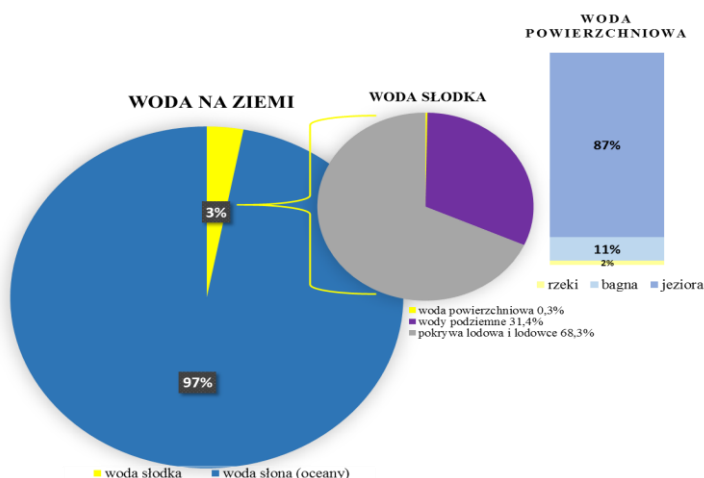
Słowa Kluczowe: barwniki, zanieczyszczenia barwnikami

Streszczenie

Intensywny rozwój wielu gałęzi przemysłu m.in. włókienniczego, papierniczego, tworzyw sztucznych, zużywających duże ilości wody stał się przyczyną zanieczyszczenia i skażenia środowiska wodnego. W związku z tym konieczne stało się ograniczenie wycieków oraz ich oczyszczanie, które poza środkami powierzchniowo czynnymi, utleniaczami, zasadami, kwasami zawierają również barwniki. Barwniki zawarte w wodzie utrudniają przenikanie promieni słonecznych, przez co hamują proces fotosyntezy i rozwój biocenozy.

1. Wstęp

Woda jest substancją niezbędną do życia. Każdy organizm zawiera wodę i potrzebuje jej żeby żyć. Nasza planeta Ziemia pokryta jest w 71% wodą. Zdecydowana większość znajduje się w morzach i oceanach i jest niedostępna do spożycia przez ludzi (około 97%), natomiast pozostałe 3% zajmuje woda słodka (łądolody, lodowce, wieczne śniegi i lód gruntowy oraz głębinowe wody podziemne). Z tych 3% tylko niewielki 0,06% jest łatwo dostępny, dla roślin, zwierząt i ludzi. Znajduje się w jeziorach, rzekach, bagnach, glebie i atmosferze oraz w samych organizmach (Rys.1).



Rys. 1. Zasoby wodne Ziemi.

Ze względu na gwałtowny wzrost liczby ludności oraz działalność przemysłową zapotrzebowanie na wodę podwaja się globalnie co 21 lat. Blisko ponad 80 krajów stanowiących 40% światowej populacji zmaga się z kryzysami wodnymi. ONZ (Organizacja Narodów Zjednoczonych) oszacowało, że do 2025 r. niedobór wodny może dotknąć aż 2,7 miliarda ludzi. Co więcej, wiele z tych krajów walczy z brakiem czystej wody. Z powodu chorób związanych ze spożyciem

zanieczyszczonej wody umiera rocznie około 5-10 milionów ludzi. W związku z powyższym zapotrzebowanie na czystą wodę z roku na rok rośnie. Poszukiwane są coraz bardziej nowoczesne i ekonomiczne technologie oczyszczania wody/ścieków. Rekultywacja, recykling i ponowne wykorzystanie ścieków są konieczne do spełnienia wymagań dotyczących wody do nawadniania, przemysłu oraz zastosowań domowych ze względu na rosnącą populację i rozwój w wielu częściach świata (Rijsberman 2006). Pod pojęciem rekultywacja rozumiemy przywracanie wartości użytkowych lub przyrodniczych terenom zniszczonym przez działalność człowieka. Ma ona na celu przywrócenie poprzednich funkcji, a także cech fizycznych, chemicznych i biologicznych jak najbardziej zbliżonych do naturalnych. W przypadku oczyszczania ścieków polega ona na wytworzeniu wody o wysokiej jakości, która jest ponownie wykorzystywana do zastosowań rolniczych i przemysłowych. Recykling ścieków opiera się na odzyskaniu wody i ponownym jej wykorzystaniu.

Ścieki to woda, która została wykorzystana do określonego celu i zawiera różnego rodzaju zanieczyszczenia pochodzące z terenów przemysłowych, rolnych i miejskich, które trzeba usunąć przed ponownym wprowadzeniem wody do środowiska. Nieoczyszczone ścieki powodują skażenie wód powierzchniowych oraz podziemnych i wyłączenie ich z użytkowania gospodarczego i społecznego. Do najbardziej niebezpiecznych zanieczyszczeń środowiska zaliczamy ścieki przemysłowe zawierające w dużej mierze związki organiczne i nieorganiczne, takie jak barwniki, związki fenolowe, związki aromatyczne i metale ciężkie (Ahuja 2009, Al-Asheh i in. 2003). Ścieki te mogą zawierać nie tylko znaczne ilości barwników, ale także środków pomocniczych (np. soli, kwasów, alkaliów, substancji powierzchniowo czynnych) oraz wiele specyficznych zanieczyszczeń (np. tłuszcze, woski, kazeina, substancje bielące, krochmal). Owe substancje trafiają do ścieków w takiej ilości, w jakiej je wprowadzono do barwnej kąpieli i co więcej nie zużywają się w procesie barwienia włókna w przeciwieństwie do barwników. Ze względu na zróżnicowany skład i pochodzenie konieczna jest ich obróbka oraz poszukiwanie prostych i efektywnych metod ich oczyszczania.

Wśród wielu znanych metod ich oczyszczania za najbardziej efektywne uznaje się obecnie metody fizykochemiczne i chemiczne. W pierwszym etapie oczyszczania ścieków zawiesiny i osady oddziela się na drodze sedymentacji grawitacyjnej, sedymentacji odśrodkowej lub filtracji złożonej. Następnie w drugim etapie w zależności od składu ścieków oczyszczanie można prowadzić jedną lub kilkomaz podanych metod: koagulacja, flokulacja, adsorpcja/wymiana jonowa, elektroliza, elektrodializa, odwrócona osmoza, neutralizacja, utlenianie i redukcja (Anielak 2000).

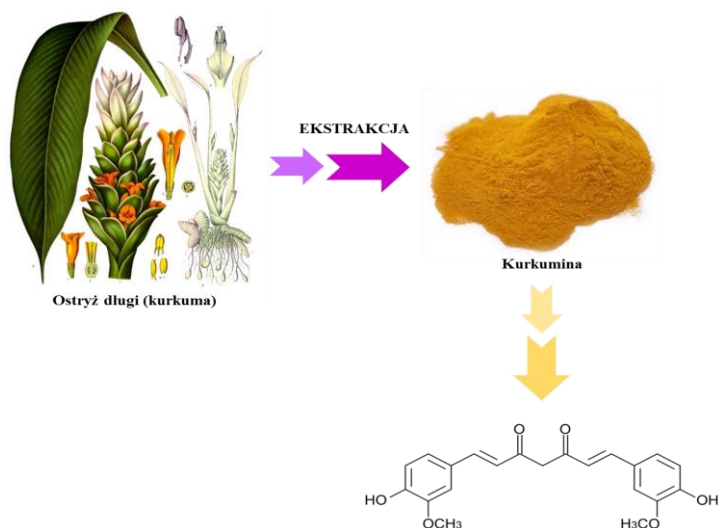
2. Opis zagadnienia

Barwniki uwalniane z przemysłu farbiarskiego mają negatywny wpływ na środowisko i ludzkie zdrowie. Zawartość barwników w ściekach włókienniczych po procesie barwienia waha się w granicach od 2 do 50% w zależności od rodzaju zastosowanego barwnika (Hessel i in. 2007).

Barwniki są to związki organiczne pochodzenia naturalnego lub syntetycznego, które nadają kolor takim substancjom jak włókno tekstylne, skóra, włosy, tworzywa sztuczne lub wosk. Człowiek od dawna wykorzystuje barwniki, niegdyś pozyskiwano je przez ekstrakcję surowców roślinnych tj. liści, kwiatów, korzenia i owoców. Po zagęszczeniu wyciągu i izolacji barwnika uzyskiwano preparaty barwiące, które są mniej szkodliwe dla konsumenta. Do dzisiaj produkowane są barwniki naturalne (Rys.4), ale wykorzystuje się je w dużo mniejszym stopniu gdyż dają mniej intensywne zabarwienie w porównaniu od tych otrzymywanych syntetycznie. Jednym z naturalnie otrzymywanych barwników jest kurkumina. Barwnik barwy żółtej, otrzymywany na drodze ekstrakcji z kłączy rośliny kurkuma. Wykorzystywana jest ona do barwienia żywności, tłuszczów oraz jako wskaźnik kwasowości tzw. papierki kurkuminowe. Hematoksylina jest niebieskim barwnikiem, pozyskiwanym z drzewa kampszewego. Najczęściej wykorzystywana jest do barwienia wełny, jedwabiu, włókien poliamidowych, włosów dając odporne na światło barwy fioletowe lub czarne. Co więcej, stosuje się ją również do barwienia komórek na czerwono w środowisku kwaśnym, natomiast w środowisku zasadowym do barwienia komórek na niebiesko.

Związki chemiczne wykorzystywane jako barwniki powinny charakteryzować się m. in. zdolnością do barwienia innych materiałów, stabilnością w postaci stałej w danej temperaturze,

odpornością na blaknięcie pod wpływem światła, chemikaliów i prania oraz odpornością na kwasy i zasady (Ozcan i Ozcan 2004). Kolor barwnika jest ściśle związany z selektywnym pochłanianiem światła o wybranej długości fali (odpowiednim kolorze). Światło widzialne składa się z fal o długościach w zakresie od około 375 lub 400 nm do około 760 lub 780 nm. Gdy promień światła napotyka pigment, części spektrum są wchłaniane przez wiązania chemiczne. W cząsteczce barwnika obecne są dwa rodzaje ugrupowań: chromoforowe i auksochromowe. Grupy, które modyfikują zdolność chromoforów do pochłaniania światła, nazywane są auksochromami (NO_2 , NO , $\text{N} = \text{N}$). Część cząsteczek, atomów lub jonów, która zapewnia kolor poprzez adsorbowanie długości fali w zakresie widzialnym (380-780 nm), nazywa się chromoforami (OH , NH_2 , NHR , NR_2 i COOH). Cząsteczki barwników mogą zawierać także inne podstawniki, które nadają im specyficzne właściwości wpływając na ich rozpuszczalność czy poprawę trwałości.



Rys. 2. Synteza naturalnych barwników.

Proces barwienia prowadzący do nadania produktom i tkaninom porządných cech i barw oparty jest na zjawisku przenoszenia cząsteczek z ośrodka otaczającego włókno do jego wnętrza. Międzyfazowy „transport” barwnika z otoczenia do wnętrza włókna jest procesem złożonym z szeregu procesów cząstkowych do których zaliczamy:

- dyfuzję barwnika z fazy otaczającej włókno do jego powierzchni,
- sorpcję barwnika na zewnętrznej powierzchni włókna,
- dyfuzję barwnika do wnętrza włókna,
- sorpcję barwnika w objętości włókna.

Podczas barwienia pomiędzy barwnikiem, a barwionym materiałem mogą tworzyć się oddziaływania międzycząsteczkowe np. siły van der Waalsa. Trwałość i łatwość wiązania cząsteczek barwnika z włóknem zależy w znacznej mierze od odpowiedniej struktury chemicznej i fizycznej włókna (Anielak 2000, Lipp-Symowicz 2003).

Barwniki można klasyfikować na dwa zasadnicze sposoby, w zależności od składu chemicznego lub zastosowania. Barwniki mają szeroki zakres zastosowania i są stosowane do barwienia wielu różnych substancji. Wykorzystywane są do nadawania koloru tkaninom i tworzywom sztucznym. Są również stosowane w przemyśle spożywczym, poligraficznym, skórzanym, a także w medycynie do barwienia preparatów farmaceutycznych (Bensalah 2009).

Barwniki organiczne są zbudowane z pochodnych aromatycznych takich związków, które dysponują ruchliwymi, luźno związanymi z cząsteczką, elektronami π (np. benzen, naftalen, antracen, związki heterocykliczne, benzydyna, fenylenodiamina) oraz różnych grup funkcyjnych. Barwniki

obejmują bardzo szeroką grupę związków. Klasyfikacja chemiczna barwników jest użyteczna w przypadku analizowania metod syntezy barwników, ich budowy chemicznej oraz zależności pomiędzy budową, a różnymi właściwościami. Uwzględnia także obecności ugrupowań chromoforowych oraz ich zastosowanie. Biorąc pod uwagę powyższe wyróżniamy barwniki polimetynowe, policyklochinonowe, nitrowe i nitrozowe, akrylometanowe, akryloaminowe, azowe. Grupą chromoforową w barwnikach azowych jest grupa azowa ($-N=N-$). W zależności od połączenia grupy azowej z grupami aromatycznymi w cząsteczce, związki te mają barwę żółtą, pomarańczową, czerwoną lub brązową. Barwniki nitrowe należą do grupy barwników w których chromoforami są grupy nitrowe $-NO_2$. Są one pochodnymi naftoli, fenoli lub amin aromatycznych. W cząsteczce zawierają grupy sulfonowe. Głównie stosowane są jako barwniki kwasowe do barwienia bawełny i jedwabiu naturalnego.

Klasyfikacja techniczna sprawdza się przy określaniu możliwości zastosowania barwników do różnych celów oraz sposobu barwienia, gdzie najważniejsze są zagadnienia rozpuszczalności i chemicznych właściwości barwników. Zgodnie z tą klasyfikacją barwniki dzielimy na kwasowe, zasadowe, zaprawowe, bezpośrednie, reaktywne, kadziowe i siarkowe. Ponadto z użytkowego punktu widzenia wyróżniamy barwniki rozpuszczalne w wodzie i nierozpuszczalne w wodzie. Do pierwszej grupy zaliczmy barwniki rozpuszczalne w wodzie z wytworzeniem barwnego kationu (barwniki zasadowe) i barwnego anionu (barwniki kwasowe, reaktywne, bezpośrednie), do drugiej grupy zaliczamy barwniki nierozpuszczalne w wodzie np. zawieszinowe lub tworzone na włóknie (barwniki lodowe, zaprawowe) (Sokołowska 2005).

3. Przegląd literatury

Barwniki reaktywne zostały odkryte w 1956 roku przez J. Rattee i P. Stephen. Ze względu na dobrą rozpuszczalność w wodzi wykorzystywane są do barwienia włókien celulozowych. Zawierają łatwo rozrywające się aktywne wiązania albo odrywające się podczas barwienia aktywne atomy lub grupy. Ich cząsteczki zawierają układy, które tworzą kowalencyjne, trwałe wiązania z grupami wodorotlenowymi celulozy. Podstawienie to zachodzi według mechanizmu nukleofilowego. Barwniki te zwykle nie wykazują dostatecznego powinowactwa do barwionych włókien. Wiązanie między włóknem, a barwnikiem tworzy się poprzez odłączenie aktywnej grupy lub rozerwanie aktywnego wiązania barwnika. Dlatego ważne jest, aby podczas barwienia barwnikami reaktywnymi alkalizować kąpiele wtedy, gdy barwniki zaczną przenikać do włókna, co spowoduje zmniejszenie stopienia hydrolizy. Wybarwienia tymi barwnikami charakteryzują się odpornością na czynniki mokre oraz bogatą paletą barw (Mielnicki 1991).

Barwniki reaktywne ze względu na szeroką gamę kolorystyczną, trwałe wiązanie z włóknem, dobre odporności otrzymanych wybarwień oraz stosunkowo łatwą syntezę są często stosowane w przemyśle włókienniczym. Czerń reaktywna 5 (Reactive Black 5, RB5), należy do grupy barwników reaktywnych i zajmuje pierwsze miejsce pod względem ilości produkcji. W przemyśle tekstylnym występuje pod różnymi nazwami: Cavalite Black B, Remazol Black GF, Remazol Black B, Diamira Black B i wiele innych (Gibbs i in. 2004). Greluk i Hubicki (Greluk i Hubicki 2013) podjęli próbę usunięcia trzech barwników reaktywnych z roztworów wodnych różniących się między sobą masą cząsteczkową i strukturą. Usuwali Reactive Black 5, Reactive Red 2 oraz Reactive Red 120 za pomocą silnie zasadowej, polistyrenowej żywicy Amberlite IRA-900. Dane eksperymentalne dotyczące adsorpcji wykazały dobrą korelację z modelem izotermy Langmuira. Analiza wskazała, że wraz ze wzrostem temp. 298-318 K pojemność sorpcyjna Amberlite IRA-900 rośnie. Maksymalną pojemność sorpcyjną dla Amberlite IRA-900 uzyskano względem Reactive Black 5 i wynosiła ona 1648 mg/g, natomiast dla Reactive Red 2 i Reactive Red 120 wynosiła kolejno: 1630 mg/g i 1043 mg/g. Cząsteczka barwnika posiadająca większe rozmiary (Reactive Red 120) dużo gorzej adsorbuje się w porównaniu do tych o mniejszych rozmiarach (Reactive Black 5). Ponadto warto również zauważyć, że barwnik Reactive Red 120 posiada więcej grup funkcyjnych w porównaniu do pozostałych, użytych barwników co również mogło się przyczynić do zmniejszenia wydajności sorpcyjnej żywicy anionowymiennej.

Równanie Langmuira wykazało dobre dopasowanie do danych eksperymentalnych dotyczących adsorpcji równowagi. Wpływ środka powierzchniowo czynnego na adsorpcję barwnika zależało wyraźnie od rodzaju środka powierzchniowo czynnego obecnego w roztworze oraz od struktury barwnika. Niejonowe i anionowe środki powierzchniowo czynne nie wykazały wpływu na adsorpcję Reactive Black 5 i Reactive Red 2. Natomiast obecność tych samych środków powierzchniowo czynnych miała wyraźny wpływ na adsorpcję Reactive Red 120. Kationowy środek powierzchniowo czynny miał negatywny wpływ na adsorpcję wszystkich trzech barwników. Pomiary kinetyczne wykazały, że cząsteczki barwników o mniejszych rozmiarach tj. Reactive Black 5 i Reactive Red 2 wykazało szybsze wiązanie z żywicą anionowymienną niż barwnik o dużej masie cząsteczkowej Reactive Red 120. Kinetyka procesu sorpcji jest zgodna z modelem kinetycznym pseudo-drugiego rzędu.

Barwniki bezpośrednie są to rozpuszczalne w wodzie sole kwasów sulfonowych. W roztworach wodnych dysocjują na barwne aniony posiadające zdolność do asocjacji. Ładunek ujemny anionu barwnika jest kompensowany przez jony sodu, rzadziej amonu. Barwniki bezpośrednie wiążą się z włóknami celulozowymi za pomocą wiązań wodorowych i sił van der Waalsa, natomiast z włóknami o charakterze amfoterycznym za pomocą wiązań jonowych. Barwniki bezpośrednie charakteryzują się silnym powinowactwem do włókien celulozowych co sprawia, że są stosowane w przemyśle włókienniczym ze względu na ich niskie koszty, szeroki zakres barw i odporność na światło.

Wawrzkievicz (Wawrzkievicz 2011) podjęła próby usunięcia C.I. Direct Red 75 z roztworów wodnych za pomocą poliakrylowych żywic, różniących się między sobą zasadowością (słabo zasadowa żywica: Amberlite IRA-67 oraz silnie zasadowa: Amberlite IRA-458). Monowarstwowe zdolności sorpcyjne Q_0 określone na podstawie modelu Langmuira dla słabo i silnie zasadowych wymienniczy anionowych wynosiły 994 mg/g i 430 mg/g, odpowiednio dla Amberlite IRA-67 i Amberlite IRA-458. Obecność soli nieorganicznych, takich jak NaCl, Na_2CO_3 i Na_2SO_4 jak również niejonowego środka powierzchniowo czynnego wykazywał jedynie niewielki wpływ na sorpcję barwnika. Wyraźny wpływ na adsorpcję tego barwnika na wymienniczych anionowych zaobserwowano w obecności kationowego środka powierzchniowo czynnego. Na podstawie obliczonych parametrów kinetycznych stwierdzono, że najlepsze dopasowanie danych eksperymentalnych uzyskano do modelu PSO (pseudo-second order). Jeżeli kinetykę procesu sorpcji lepiej opisuje model pseudo-drugiego rzędu to wykres zależności t/qt vs t jest liniową zależnością, z której można określić q_e i k_2 . Co więcej wysokie wartości współczynnika determinacji R^2 oraz wartości $q_{e,exp}$, które są zbliżone do tych wyliczonych z równania Ho wskazują na dopasowanie do tego modelu. Wartości współczynnika R^2 podczas sorpcji Direct Red 75 na Amberlite IRA-458 mieściły się w granicach 0.631-0.999, natomiast podczas sorpcji na Amberlite IRA-67 $R^2=0.999$.

W ciągu ostatnich kilku lat dosyć popularne stało się poszukiwanie nowych i tanich sorbentów, które często są produkowane z materiałów odpadowych (z ang. low-cost). Niektóre z tych sorbentów powstają z substancji odpadowych, które nie znajdują już żadnego zastosowania, zaliczamy do nich m. in. łuski ryżowe, skórki, pestki owoców cytrusowych, odpady rolnicze, popioły lotne, torf, żużel oraz wiele innych (Bulut i Aydın 2006). Przykładem takiego sorbentu są łuski ryżowe wykorzystane przez Safa i Bhatti do usunięcia Direct Red 31 i Direct Orange 26 z roztworów wodnych (Safa i Bhatti 2011). Przeprowadzone badania wykazały, że model Langmuira zapewnił najlepszą korelację danych eksperymentalnych dla obu barwników. Maksymalna pojemność sorpcyjna użytego sorbentu względem Direct Red 31 i Direct Orange 26 wynosiła kolejno: 129 mg/g i 66 mg/g. Wydajność usuwania Direct Red 31 i Direct Orange 26 z roztworów wodnych rośnie wraz ze wzrostem początkowego stężenia barwnika, masy sorbentu i temperatury. Kinetykę procesu sorpcji najlepiej opisuje model pseudo-drugiego.

Barwniki kwasowe stanowią jedną z najliczniejszych grup barwników. Są one solami kwasów organicznych (najczęściej sulfonowych i karboksylowych) oraz rzadziej fenolami rozpuszczalnymi w wodzie. Należą do mocnych elektrolitów i w roztworach wodnych ulegają dysocjacji tworząc barwne aniony. Ładunek ujemny kompensowany jest przeważnie przez kationy sodowe lub amonowe. Barwniki te wiążą się z włóknami za pomocą wiązań jonowych. Ich trwałe wiązanie z tworzywem włókna można osiągnąć poprzez dodanie do kąpieli barwiącej kwasów. Pod

względem budowy chemicznej są to barwniki azowe (mono- i diazowe) (Mielnicki 1991). Barwinki kwasowe usuwano z roztworów wodnych wykorzystując różnego typu sorbenty, dane przedstawiono w tabeli 1.

Tab. 1. Usuwanie barwników kwasowych z roztworów wodnych na różnego typu sorbetach.

Barwnik	Sorbent	Pojemność (mg/g)	Lit.
Acid Orange 10	Chitosan	922,9	(Wong2004)
Acid Red 73		728,2	
Acid Red 18		693,2	
Acid Green 25		645,1	
Acid Orange 7	Amberlite IRA-900	1289,7	(Greluk i Hubicki 2013)
	Amberlite IRA-910	1097,6	
	Amberlyst A-21	235,1	
Acid Orange 10	Amberlite IRA-900	1012,6	
	Amberlite IRA-910	923,5	
	Amberlyst A-21	139,1	

4. Podsumowanie

Ścieki pochodzące z różnych gałęzi przemysłu, zawierające barwinki stanowią groźne zanieczyszczenie środowiska naturalnego, dlatego konieczna i uzasadniona jest ochrona i oczyszczanie wód. Zdolność usuwania różnego typu zanieczyszczeń w tym również barwników zależy przede wszystkim od właściwości fizykochemicznych wykorzystywanych do tego celu sorbentów. Znajomość pojemności sorpcyjnych zastosowanych sorbentów w stosunku do barwników wskazuje na ogrom możliwości technologicznych mających na celu usprawnienie i unowocześnienie dotychczas zaproponowanych rozwiązań technologicznych.

5. Literatura (wymieniona alfabetycznie)

- Ahuja S (2009) Handbook of water purity and quality. IWA Publishing, Great Britain.
- Al-Asheh S, Banat F, Abu-Aitah L (2003) Adsorption of phenol using different types of activated bentonites. Separation and Purification Technology 33: 1-10.
- Anielak AM (2000) Chemiczne i fizykochemiczne oczyszczanie ścieków. PWN, Warszawa.
- Bulut Y, Aydin H (2006) A Kinetics and Thermodynamics Study of Methylene Blue Adsorption on Wheat Shells. Desalination 194: 259-267.
- Bensalah N, Alfaro M, Martínez-Huitle C (2009) Electrochemical treatment of synthetic wastewaters containing Alphazurine A dye. Chemical Engineering Journal 149: 348-352.
- Dzieniszewska A, Kyzioł-Komosińska J (2018) Zdolności sorpcyjne wybranych substancji bogatych w materię organiczną w stosunku do barwników. Polska Akademia Nauk, Komitet Inżynierii Środowiska, Monografie Nr. 142, Zabrze.
- Gibbs G, Tobin JM, Guibal E (2004) Influence of chitosan preprotonation on reactive black 5 sorption isotherms and kinetics. Industrial & Engineering Chemistry Research, 43: 1-11.

- Greluka M, Hubicki Z (2013) Evaluation of polystyrene anion exchange resin for removal of reactive dyes from aqueous solutions. *Chemical Engineering Research and Design* 91: 1343–1351.
- Greluk M, Hubicki Z (2013) Effect of basicity of anion exchangers and number and positions of sulfonic groups of acid dyes on dyes adsorption on macroporous anion exchangers with styrenic polymer matrix. *Chemical Engineering Journal* 215–216: 731-739.
- Hessel C, Allegre C, Maisseu M, Charbit F, Moulin P (2007) Guidelines and legislation for dye house effluents. *Journal of Environmental Management* 89: 171-180.
- Lipp-Symowicz B (2003) Fizykochemiczny aspekt procesu barwienia i rozjaśniania optycznego włókien. PAM Łódź.
- Mielnicki J, (1991) Zarys chemicznej obróbki wyrobów włókienniczych. WNT, Warszawa
- Ozcan AS, Ozcan A (2004) Adsorption of acid dyes from aqueous solutions onto acid-activated bentonite. *Journal of Colloid and Interface Science* 276: 39-46.
- Rijsberman FR (2006) Water Scarcity: Fact or Fiction. *Agricultural Water Management* 80: 5-22.
- Safa Y, Bhatti HN (2011) Kinetic and thermodynamic modeling for the removal of Direct Red-31 and Direct Orange-26 dyes from aqueous solutions by rice husk. *Desalination* 272: 313-322
- Sokołowska J (2005) Barwniki w nowoczesnych technikach. Łódzkie Towarzystwo Naukowe, Łódź.
- Wawrzekiewicz M (2011) Comparison of gel anion exchangers of various basicity in direct dye removal from aqueous solutions and wastewaters. *Chemical Engineering Journal* 173: 773– 781.
- Wong YC, Szeto YS, Cheung WH, McKay G (2004) Adsorption of acid dyes on chitosan equilibrium isotherm analyses. *Process Biochemistry* 39: 695-704.

11. Biokompatybilność syntetycznych materiałów polimerowych

Biocompatibility of synthetic polymer materials

Kacper Przykaza

Katedra Zjawisk Międzyfazowych, Instytut Nauk Chemicznych,
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Plac Marii Curie-Skłodowskiej 3, 20-031 Lublin
Opiekun naukowy: dr hab. Agnieszka Ewa Wiącek, prof. UMCS

Kacper Przykaza: przykaza.kacper@poczta.umcs.lublin.pl

Słowa kluczowe: polimery, biokompatybilność, właściwości powierzchniowe

Streszczenie

Syntetyczne polimery zyskują coraz większą popularność w ciągu ostatnich dziesięcioleci, a obecnie towarzyszą ludziom na każdym etapie codziennego życia. Jednak w ostatnich latach, ze względu na ich konkurencyjne właściwości i podatność na modyfikacje, tworzywa sztuczne stały się siłą napędową szybkiego rozwoju technologii w wielu dziedzinach nauki. Biopolimery cieszą się szczególnym zainteresowaniem w różnych gałęziach medycyny, takich jak implantologia tkanek kostnych, chrzęstnych, skórnych, a także naczyń krwionośnych. Biomateriały o takich specyficznych zastosowaniach muszą charakteryzować się odpowiednimi cechami mechanicznymi i wytrzymałościowymi, a przede wszystkim muszą być kompatybilne względem otaczających tkanek, ludzkiej krwi i jej składników, czyli wykazywać wysoką hemo- i biokompatybilność.

1. Wstęp

Odpowiedź biologiczna tkanek i krwi na biomateriały jest bardzo złożona i wciąż słabo poznana. Przez lata najbardziej odpowiednimi materiałami były materiały obojętne, które nie indukują odpowiedzi organizmu przez co nie jest możliwa integracja biomateriału z żywą tkanką. Dzisiaj uważa się, że materiały biokompatybilne, powinny wywoływać odpowiednią reakcję organizmu i zapobiegać infekcjom, reakcjom zapalnym, czy niepożądanemu krzepnięciu krwi. W celu poprawy właściwości materiałów mających kontakt z tkankami stosuje się różne metody obróbki ich powierzchni. Metody te dzielą się na dwa główne typy modyfikacji: mechaniczne i fizykochemiczne. Mechaniczne metody obróbki nie są szczególnie wartościowe, ponieważ często powodują uszkodzenia i zmiany innych właściwości materiału. Metody obróbki fizykochemicznej dzielą się na: mokre metody chemiczne, które obejmują obróbkę różnymi odczynnikami chemicznymi w środowisku wodnym lub ciekłym oraz obróbkę gazową, w tym obróbkę plazmą, obróbkę wiązką jonów, strumieniem elektronów, strumieniem fotonów (lasery), czy promieniowaniem rentgenowskim. Aby poprawić biokompatybilność tworzyw sztucznych, często stosuje się pokrycia polimeru innymi substancjami w celu wytworzenia tzw. warstwy przeciwzakrzepowej. Są to między innymi: heparyna, albumina, czy chitozan. Oprócz tego, w celu poprawy biokompatybilności stosuje się również metodę, która polega na adhezji i namnożeniu na powierzchni polimeru komórek śródbłonna. Zespół Heeringa był pionierem w pokrywaniu implantów protetycznych *in vitro* komórkami śródbłonna (Heering i in. 1978). Jednak zanim naukowcy odnieśli sukces, wiele powierzchni polimerowych musiało być uprzednio zmodyfikowanych, aby uzyskać odpowiedni stopień adhezji komórek.

Inną metodą poprawy biokompatybilności materiałów jest zastosowanie zimnej plazmy gazowej, co niesie za sobą wiele zalet w porównaniu z innymi metodami. Przede wszystkim modyfikowane powierzchnie nie wymagają specjalnego przygotowania, a procedury są stosunkowo łatwe, tanie, szybkie i przyjazne dla środowiska. Obróbka plazmą może również modyfikować ładunek powierzchniowy, chropowatość i stopień krystaliczności polimeru, co ma istotny wpływ na adhezję komórek (Junkar i in. 2009). Do modyfikacji powierzchni polimerowych stosuje się wiele różnych rodzajów plazmy, w zależności od ich wymagań i konkretnego zastosowania. Rodzaj zastosowanego gazu (np. tlenu, azotu, argonu) odpowiada za tworzenie się na powierzchni

określonych grup funkcyjnych, które mogą być zarówno hydrofobowe jak i hydrofilowe (Wang i in. 2010).

2. Pojęcie biokompatybilności w kontekście sztucznych materiałów polimerowych

Najogólniej biokompatybilność jest definiowana jako zdolność materiału do wywołania specyficznej odpowiedzi w określonym zastosowaniu u pacjenta (Ratner i in. 2004). Reakcje hemolityczne, toksykologiczne i immunologiczne w przypadku materiałów mających kontakt z krwią i tkankami nie są już tak problematyczne jak w czasach ich pierwszych testów na zwierzętach. Natomiast nadal głównym problemem są reakcje zakrzepowe i możliwość krwawienia po wszczepieniu ciała obcego do organizmu człowieka. Istnieje wiele hipotez, dlaczego pomimo ogromu wiedzy i długoletnich badań nadal nie udało się uzyskać w pełni biokompatybilnej powierzchni. Jeden z postulatów mówi, że nie jest możliwe wytworzenie sztucznej powierzchni, która ma takie same cechy i strukturę jak powierzchnia naturalna. Przykładowo, żywe naczynia krwionośne mają warstwę komórek śródbłonna, która jest stale odnawiana, a co za tym idzie komórki ją budujące wytwarzają substancje przeciwzakrzepowe, takie jak prostacyklina, czy glikokaliks i uwalniają je w odpowiedzi na parametry krwi, które ciągle się zmieniają. W konsekwencji, wielokrotne próby odtworzenia fizjologicznego stanu naczyń krwionośnych nie dochodzą do skutku. Inna hipoteza dotyczy rozpoznawania składników krwi i procesów związanych z aktywacją płytek krwi oraz krzepnięciem, aczkolwiek mechanizmy tych akcji są bardzo złożone i wciąż nie w pełni poznane. Błony płytek krwi zawierają ponad sto różnych receptorów oligosacharydowych i białkowych, które biorą udział w procesie generowania i odbierania sygnałów między czynnikami środowiskowymi a płytkami krwi. Wiadomo, że gdy materiał syntetyczny ma kontakt z krwią, najpierw wchodzi on w reakcje z białkami krwi i w zależności od właściwości powierzchni polimeru na jego powierzchni adsorbuje się film albumin (Kolar i in. 2015). Niemniej jednak, nie określono dokładnie, czy aktywacja płytek krwi zależy od ilości białek zaadsorbowanych na powierzchni, czy od konformacji ich najbardziej zewnętrznej warstwy. Kolejnym problemem jest to, że nie ma standardowych metod, które mogłyby określić biokompatybilność materiałów. Badania przeprowadzane są głównie na poszczególnych składnikach krwi w różnych warunkach, które trudno jest ze sobą porównać. We wszystkich trwających badaniach w tej dziedzinie istnieje wiele materiałów, które są potencjalnie lepsze niż te, które były dotychczas stosowane, aczkolwiek do ich praktycznego zastosowania jest jeszcze daleka droga, ponieważ należy je przetestować i uzyskać niezbędną dokumentację, co wiąże się z wysokimi kosztami badań (Gorbet i in. 2004).

3. Czynniki wpływające na biokompatybilność tworzyw sztucznych

Biokompatybilność materiału zależy w dużej mierze od jego właściwości powierzchniowych. Pierwsze kilka warstw atomowych na powierzchni danego materiału jest swego rodzaju przekaźnikiem (łącznikiem) biologicznym między komórkami a biomateriałem, od którego zależy sukces przeszczepu lub urządzenia medycznego wykonanego z takiego materiału (Ratner 1993).

3.1 Wpływ obróbki plazmowej na biokompatybilność materiałów polimerowych

Zastosowanie plazmy prowadzi do modyfikacji topografii powierzchni, zwiększa chropowatość wielu materiałów, w tym polimerowych. Wykazano, że taka modyfikacja ma znaczący wpływ na adhezję i aktywację płytek krwi. Nawet krótka ekspozycja powierzchni biomateriału na plazmę powietrzną poprawia adhezję i w niektórych przypadkach aktywację płytek krwi, głównie poprzez wzbogacenie powierzchni w nowe grupy zawierające tlen. Jednak efekty obróbki plazmą cofają się z czasem, a znaczna ilość grup zawierających tlen znika z powierzchni w ciągu 3 godzin od jej modyfikacji (Modic i in. 2012). Aktywacja plazmą ma również wpływ na odpowiedź biologiczną. Wykazano, że modyfikacja powierzchni polimerowych zimną plazmą poprawia proces proliferacji komórek fibroblastów i śródbłonna, a jednocześnie liczba przylegających płytek krwi nie ulega zmianie (Junkar i in. 2011). Uros i in. (2011) badali proces powstawania mikro- i nanostruktur na powierzchni politereftalanu etylenu (PET) wykorzystywanego do produkcji syntetycznych naczyń

krwionośnych i stentów. Modyfikowali powierzchnie polimeru PET za pomocą słabo zjonizowanej i silnie zdysocjowanej plazmy tlenowej lub azotowej o częstotliwości radiowej. Otrzymane wyniki pokazały, że obróbka powierzchniowa plazmą tlenową i azotową poprawiła proliferację komórek śródbłonna, która była wzmacniana z rosnącym czasem plazmowania o 15 do 30%. Zjawisko to, podobnie jak w przypadku poprzednich badań wyjaśniono tworzeniem się nowych grup funkcyjnych na powierzchni i modyfikacją jej nano- i mikrostruktury, co sprzyjało adhezji komórek.

3.2 Wpływ składu chemicznego powierzchni na biokompatybilność materiałów polimerowych

Skład chemiczny powierzchni jest jedną z kluczowych cech, którą należy rozważyć podczas projektowania materiałów potencjalnie biokompatybilnych. Istnieją różne sposoby kontrolowania powierzchni za pomocą określonych grup funkcyjnych, takich jak: grupy hydroksylowe, metylowe, siarczanowe, karboksylowe, czy aminowe (Seifert i in. 2002). Udowodniono, że ich obecność poprawia proces immobilizacji i adhezji różnych biomolekuł, takich jak: białka, enzymy, a to z kolei umożliwia modulowanie odpowiedzi komórkowej. Interakcja komórek z powierzchnią biomateriału nigdy nie jest bezpośrednia, ponieważ powierzchnia jest wcześniej pokryta cząsteczkami wody i białkami absorbowanymi z płynów ustrojowych. Proces ten odbywa się w kilku etapach: faza wczesna, w której mają miejsce zdarzenia krótkotrwałe, takie jak np. adhezyjne połączenie między komórkami i materiałem, kolejno następuje faza transdukcji sygnału, obejmująca biomolekuły, takie jak białka macierzy pozakomórkowej (ECM), błony komórkowej, komórki białek szkieletowych (Anselme 2000). Kiedy implant ma kontakt z komórkami *in vitro* lub gdy wchodzi one w kontakt z powierzchnią biomateriału *in vivo*, białka z pożywki hodowlanej lub płynów ustrojowych adsorbują się i tworzą warstwę białkową na jego powierzchni. Następnie komórki przyczepiają się do powierzchni pokrytej białkami, rozprzestrzeniają się i uwalniają białka cytoszkieletu oraz integryny, które pomagają im silnie przylegać do powierzchni. Kolejno, białka łączą się, a cytoszkielet ulega reorganizacji i w miarę możliwości dostosowuje się do topografii powierzchni, następnie może aktywnie rozprzestrzeniać się po podłożu. W fazie końcowej komórki, w obszarze styku z materiałem syntetyzują białka ECM, które zapewniają im stabilność kształtu oraz obszaru na granicy komórka-macierz-polimer (Trepatt i in. 2008). Adhezja komórek jest bardzo różnorodna i zależy od fenotypu komórek, dlatego mechanizmy adhezji krwi różnią się od mechanizmu komórek tkanek łącznych, takich jak fibroblasty, osteoblasty, czy komórek pochodzących ze śródbłonna i nabłonka (np. keranocytów). Wyniki wielu badań nie doprowadziły jeszcze do wytworzenia idealnej powierzchni. Grunkemeier i in. (1998) postulowali, że zwiększenie liczby grup tlenowych na powierzchni wpływa na hamowanie aktywacji procesu krzepnięcia. Podobnie inni badacze twierdzili, że większa ilość tych grup bierze udział w zmniejszeniu ilości wiązanego fibrynogenu, co prowadzi do mniejszej liczby związanych płytek krwi (Rodrigues i in. 2006). Wang i in. (2006) modyfikowali powierzchnię polimeru PET plazmą acetylenową, zwiększając w ten sposób ilość grup zawierających węgiel na powierzchni. Tak zmodyfikowana powierzchnia hamowała adhezję i aktywację płytek krwi. Podobne zależności zaobserwowano również po obróbce poliuretanu plazmą azotową. Natomiast polepszoną adhezję i proliferację komórek zaobserwowano na próbkach PET i polistyrenu traktowanych plazmą tlenową, podczas gdy próbki traktowane plazmą tetrafluorometanu lub plazmą azotową nie wykazywały znaczącej poprawy właściwości adhezyjnych wobec żywych komórek. Z kolei inny zespół badaczy obserwował, że nowo wprowadzone grupy funkcyjne tlenu na PET stymulowały wzrost i proliferację komórek śródbłonna o 25% w porównaniu z próbą kontrolną nieaktywowaną plazmą (Vesel i in. 2011). Powyższe badania dowodzą, że zastosowanie zarówno plazmy tlenowej, jak i azotowej do modyfikacji oraz aktywacji powierzchni materiałów polimerowych w odpowiednio dobranych warunkach może poprawiać adhezję i proliferację komórek na powierzchniach implantów, przez co zwiększać ich biokompatybilność.

3.3 Wpływ topografii powierzchni polimerów na ich biokompatybilność

Przy produkcji biomateriałów ważne jest uwzględnienie wpływu struktury powierzchni materiału na odpowiedź biologiczną. Naturalne tkanki miękkie, jak i twarde charakteryzują się oczywiście optymalną biokompatybilnością, dlatego konieczne jest poznanie ich złożonej budowy, która ma zazwyczaj charakter multistrukturalny. Istnieje wiele metod fizycznych i chemicznych, które pozwalają na modyfikację powierzchni oraz uzyskanie wielowarstwowej nanostruktury.

Najczęściej stosowanymi metodami są: fotolitografia, litografia koloidalna, trawienie laserowe, wytwarzanie nano-ceramiki, agregacja supramolekularna, powlekanie powierzchni nanorurkami węglowymi, nanodrutami, nanokompozytami, a także techniki z wykorzystaniem plazmy, takie jak: implantacja jonów, czy rozpylanie plazmowe (Liu i in. 2010). Fan i in. (2009) stworzyli struktury z rowkami o szerokości 500 nm i wysokości około 100 nm oraz o wielkości $100 \text{ nm} \times 4 \text{ nm}$ na powierzchni polidimetylosiloksanu (PDMS) przy użyciu samoorganizujących się warstw oraz techniki litografii. Próbką kontrolną była niezmodyfikowana, gładka powierzchnia PDMS, powierzchnia z nanorówkami oraz powierzchnia wyłącznie z nanozagłębieniami. Analizy przyczepności płytek krwi wykazały, że tylko na powierzchni PDMS zawierającej zarówno rowki, jak i punktowe zagłębienia liczba związanych płytek krwi znacznie się zwiększyła. Na tej podstawie ustalono, że wzrost chropowatości powierzchni, a tym samym zwiększenie pola powierzchni dostępnego do wiązania płytek zwiększa ich trombogeniczność. Chropowatość jest najczęstszym stosowanym w literaturze terminem wykorzystywanym do charakteryzowania powierzchni. Niemniej jednak parametr ten nie mówi wiele o faktycznej topografii powierzchni, a podaje jedynie jej średnie pofalowanie. Celem wyjaśnienia obserwowanych odpowiedzi immunologicznych i hemostatycznych, naukowcy wysnuli kilka hipotez łączących topografię powierzchni z odpowiedzią komórkową. Jedna z nich mówi, że odpowiedź hemostatyczna opiera się na znacznym zmniejszeniu powierzchni kontaktu między polimerem a płytkami krwi z powodu wysokiej chropowatości próbek polimeru poddanych działaniu plazmy. Według Chena i in. (2018) wartości parametru chropowatości, które są kluczowe dla wiązania płytek krwi, można podzielić na trzy grupy. Pierwsza grupa obejmuje obszary o chropowatości większej niż $2 \text{ }\mu\text{m}$, co odpowiada rozmiarowi płytek krwi. Druga grupa to powierzchnie o chropowatości mniejszej niż $2 \text{ }\mu\text{m}$, w których prawidłowe zaprojektowanie struktur może zmniejszyć powierzchnię styku płytek krwi, a w konsekwencji ich przyczepność. Trzecia grupa obejmuje wartości chropowatości większe niż 50 nm , gdzie struktury powierzchniowe są znacznie mniejsze niż nibynóżki komórkowe. Są to stosunkowo gładkie powierzchnie, które nie odgrywają roli w adhezji płytek krwi. W takich przypadkach prawdopodobne jest, że inne czynniki będą zaangażowane w zmniejszanie trombogeniczności, między innymi wiązanie i konformację białek osocza, w szczególności fibrynogenu i albumin. Według innych autorów przy projektowaniu struktury powierzchni ważne jest, aby wziąć pod uwagę jej wszystkie wymiary (tj. wysokość, szerokość mikro- i nanostruktur oraz odległości pomiędzy nimi) (Mozetic i in. 2015). W wielu badaniach wykazano, że komórki reagują na topografię i strukturę powierzchni dopasowując się do jej określonych cech np. rowków, czy grzbietów. Niestety zachowanie komórek w odniesieniu do nano-topografii jest nadal niedostatecznie poznane i opisane. W innym, niezależnym eksperymencie optymalną przyczepność ludzkich komórek kostnych obserwowano na mało zorganizowanych i chropowatych powierzchniach (Thery i in. 2006). Niektórzy badacze sądzą, że ludzkie komórki reagują na nieciągłości powierzchni dla pewnych określonych długości. Jest to związane z mechanizmem komórkowym wrażliwości mechanicznej, który wiąże się z procesem adhezji komórkowej matrycy za pośrednictwem białka integryny (Bershadsky i in. 2006). W konsekwencji pojawiły się różne hipotezy dotyczące tego, jak komórki rozpoznają morfologiczne nieciągłości powierzchniowe. Jedna z nich dotyczy termodynamiki i adsorpcji białek macierzy zewnątrzkomórkowej. Inna natomiast proces ten tłumaczy tym, że nieciągłość powierzchni może działać jako bariera energetyczna, gdzie jej wielkość zależy zarówno od geometrii, jak i chemii powierzchni (Feinberg i in. 2008). Stevenson i Donald (2009) badali adhezję komórek do różnych substratów w skali mikro i zaobserwowali, że stopień ich adhezji zależy od odległości między grzbietami struktury powierzchniowej. Dla odległości wynoszącej $\sim 10\text{--}20 \text{ }\mu\text{m}$ komórki były w stanie zaadsorbować się i łączyć mostkowo pomiędzy sąsiednimi grzbietami. Przy umiarkowanych odstępach od $\sim 30\text{--}50 \text{ }\mu\text{m}$ komórki łączyły się już tylko z pojedynczym grzbietem lub rowkiem, a przy największej wartości odległości $\geq 50 \text{ }\mu\text{m}$ komórki łączyły się wyłącznie między grzbietem a rowkiem. Na podstawie tych wyników autorzy zaproponowali wartości parametrów zarówno długości krytycznej, jak i krytycznego kąta nachylenia rowkowanych struktur powierzchniowych. Ponadto uogólniono wniosek, że komórki dostosowują swój kształt do topografii powierzchni, co powoduje reorganizację ich cytoszkieletu oraz struktur odpowiadających za adhezję.

3.4 Wpływ zwilżalności powierzchni polimerów na ich biokompatybilność

Zwilżalność jest jedną z najważniejszych właściwości powierzchni i ma bardzo duży wpływ na generowaną w ustroju odpowiedź komórkową, która najczęściej wiąże się z adsorpcją białek. Hydrofobowe powierzchnie dużo chętniej wiążą białka niż ich hydrofilowe odpowiedniki, przede wszystkim ze względu na występowanie silnych oddziaływań odpychających wynikających z kontaktu białka z hydrofilową powierzchnią biomateriału, na której obecne są silnie związane cząsteczki wody. Oprócz ilości wiązanych białek, zwilżalność wpływa również na ich konformację. Biorąc pod uwagę, że kontakt biomateriału z krwią i płynami ustrojowymi prowadzi do natychmiastowego kontaktu z białkami, fakt ten jest niezmiernie ważny w kontekście wiązania i aktywacji płytek krwi, a zatem dla finalnej biokompatybilności polimeru. W jednym z eksperymentów Xu i Siedlecki (2007) modyfikowali powierzchnie polietylenu zimną plazmą powietrzną, co pozwoliło na uzyskanie powierzchni o różnym charakterze hydrofobowo-hydrofilowym. Wpływ takiej modyfikacji na wiązanie białek sprawdzono poprzez testy adsorpcji trzech białek osocza krwi: fibrynogenu, albuminy surowicy i czynnika ludzkiego XII. Przy wartościach kątów zwilżania wody w zakresie między 60° a 65°, obserwowano znaczny wzrost adhezji badanych białek. Drugą metodą badania otrzymanych próbek było użycie mikroskopu sił atomowych (AFM). Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że siła adhezji białek do powierzchni polimeru zmienia się w czasie, co sugeruje, iż po związaniu białek z powierzchnią zachodzą w ich strukturze zmiany konformacyjne. Podobne wyniki uzyskano również w przypadku poliuretanu, gdzie obserwowano znaczący wzrost siły wiązania fibrynogenu przy umiarkowanej hydrofilowości powierzchni (kąt zwilżania wody = 65°). Zmiany konformacji monitorowano w procesie wiązania przeciwciał monoklonalnych i stwierdzono, że zachodzą one w zależności od polarności powierzchni (Xu i in. 2006). Adhezja molekuł do powierzchni jest procesem zależnym od czasu a jej mechanizm jest wieloetapowy. Pierwszymi cząsteczkami, które wchodzi w kontakt z powierzchnią, są cząsteczki wody, oddziałujące z nią zgodnie z jej właściwościami. Tworzą one na powierzchni polimeru warstwę, od której zależy wiązanie innych molekuł. Jeśli w roztworze znajduje się mieszanina różnych białek, ich wiązanie z powierzchnią polimerową zależy zarówno od ich wielkości oraz polarności. Z czasem może nastąpić ich wymiana, ponieważ dynamiczne zmiany konfokalne i reorientacja mogą wpływać na zmianę siły wiązań, a w konsekwencji na aktywność białka. Wpływ zwilżalności powierzchni na wiązanie płytek oraz białek krwi jest również przedmiotem wielu badań. W 2002 r. Spijker i in. (2002) badali adhezję i aktywację płytek krwi na polietylenie, którego charakter hydrofobowo-hydrofilowy modulowano za pomocą obróbki zimną plazmą tlenową i azotową. Badacze doszli do wniosku, że adhezja płytek krwi była większa na powierzchniach hydrofilowych, ale już ich aktywność zwiększała się na powierzchniach bardziej hydrofobowych. Do tych samych wniosków doszedł Vogler i in. (1995). Natomiast wielu innych badaczy w swoich badaniach otrzymało dokładnie przeciwne wyniki, ponieważ w swoich eksperymentach największą liczbę zarówno związanych, jak i aktywowanych form płytek krwi obserwowali na powierzchniach hydrofilowych (Lee i in. 1998; Sperling i in. 2005; Rodrigues i in. 2006). Adhezja komórek na powierzchniach o różnej hydrofilowości była również badana przez Yanagisawę i in. 1989. Zauważyli oni, że szybkość wiązania komórek i ich rozprzestrzenianie było najwyższe na podłożach charakteryzujących się kątem zwilżania wody poniżej 60°, a w przypadku bardziej hydrofobowych powierzchni wartości te były znacznie niższe. Pomimo faktu, że zwilżalność powierzchni odgrywa ważną rolę w hemo- i biokompatybilności syntetycznych materiałów, trudno jest wyciągnąć jednoznaczne wnioski z tak wielu sprzecznych wyników. Jednym z głównych powodów jest złożoność procesów zachodzących we krwi oraz podczas kontaktu krwi z biomateriałem. Ważne jest, aby poszczególnych oddziaływań nie rozpatrywać osobno, a takie wielowymiarowe układy biomateriał-żywa tkanka należy traktować jako całość i brać pod uwagę interakcje między poszczególnymi ciągami przyczynowo-skutkowymi.

4. Podsumowanie

Mechanizmy rządzące oddziaływaniami pomiędzy żywą tkanką a ciałami obcymi są bez wątpienia jedną z najbardziej nurtujących zagadek współczesnego świata nauki. Stosunkowo młoda metoda modyfikacji powierzchni ciała stałego – obróbka z wykorzystaniem zimnej plazmy wydaje się być jedną z najkorzystniejszych metod obróbki polimerów i znacznie poprawia ich bio-

i hemokompatybilne właściwości. Wiele badań potwierdziło hipotezę, że kompatybilność powierzchni rośnie wraz ze wzrostem hydrofilowości i chropowatości powierzchni. Mimo, że na chwilę obecną ludzie posiadają już bardzo szeroką wiedzę na temat natury tych procesów wydaje się, że do opracowania ogólnego schematu tworzenia w pełni bio- i hemokompatybilnego materiału potrzeba jeszcze wielu lat badań i rozwoju.

5. Bibliografia

- Anselme K (2000) Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 21: 667–681.
- Bershadsky A, Kozlov M, Geiger B (2006) Adhesion-mediated mechanosensitivity: A time to experiment and a time to theorize. *Curr Opin Cell Biol* 18: 472–481.
- Chen L, Han D, Jiang L (2011) On improving blood compatibility: From bioinspired to synthetic design and fabrication of biointerfacial topography at micro/nano scales. *Colloids Surf B Biointerfaces* 85: 2–7.
- Fan H, Chen P, Qi R, Zhai J, Wang J, Chen L, Chen L, Sun Q, Song Y, Han D (2009) Greatly improved blood compatibility by microscopic multiscale design of surface architectures *Small* 5: 2144–2148.
- Feinberg AW, Wilkerson WR, Seegert CA, Gibson AL, Hoipkemeier-Wilson L, Brennan AB (2008) Systematic variation of microtopography surface chemistry and elastic modulus and the state dependent effect on endothelial cell alignment. *J Biomed Mater Res Part A* 86: 522–534.
- Gorbet MB, Sefton MV (2004) Biomaterial-associated thrombosis: Roles of coagulation factors complement platelets and leukocytes. *Biomaterials* 25: 5681–5703.
- Grunkemeier J, Tsai W, Horbett T (1998) Hemocompatibility of treated polystyrene substrates: Contact activation platelet adhesion and procoagulant activity of adherent platelets. *J Biomed Mater* 41: 657–670.
- Herring M, Gardner A, Glover J (1978) A single-staged technique for seeding vascular grafts with autogenous endothelium. *Surgery* 84: 498–504.
- Junkar I, Cvelbar U, Vesel A, Hauptman N, Mozetič M (2009) The Role of Crystallinity on Polymer Interaction with Oxygen Plasma *Plasma Process Polym* 6: 667–675.
- Lee JH, Lee HB (1998) Platelet adhesion onto wettability gradient surfaces in the absence and presence of plasma proteins. *J Biomed Mater Res* 41: 304–311.
- Liu X, Chu PK, Ding C (2010) Surface nano-functionalization of biomaterials. *Mater Sci Eng* 70: 275–302.
- Modic M, Junkar I, Vesel A, Mozetic M (2012) Aging of plasma treated surfaces and their effects on platelet adhesion and activation. *Surface Coat Technol* 213: 98–104.
- Mozetič M, Stana-Kleinschek K, Fröhlich M, Turk B, Vesel A (2015) Covalent binding of heparin to functionalized PET materials for improved haemocompatibility. *Materials* 8: 1526–1544.
- Mozetič M, Primc G, Vesel A, Modic M, Junkar I, Recek N, Klanjšek-Gunde M, Guhy L, Sunkara MK, Assensio MC (2015) Application of extremely non-equilibrium plasmas in the processing of nano and biomedical materials *Plasma Sources. Sci Technol* 24: 15-26.
- Uroš C, Ita J, Martina M (2011) Hemocompatible poly(ethylene terephthalate) polymer modified via reactive plasma treatment. *J Appl Phys* 50: 08JF02.
- Ratner BD (1993) The blood compatibility catastrophe. *J Biomed Mater Res* 27: 283–287.
- Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE (2004) *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine* Elsevier: Amsterdam The Netherlands 2004.
- Rodrigues SN, Goncalves IC, Martins MC, Barbosa MA, Ratner BD (2006) Fibrinogen adsorption platelet adhesion and activation on mixed hydroxyl-/methyl-terminated self-assembled monolayers. *Biomaterials* 27: 5357–5367.
- Seifert B, Mihanetzis G, Groth T, Albrecht W, Richau K, Missirlis Y, Paul D, von Sengbusch G (2002) Polyetherimide: a new membrane-forming polymer for biomedical applications. *Artif Organs* 26: 189–199.
- Spijker HT, Bos R, Busscher HJ, van Kooten T, van Oeveren W (2002) Platelet adhesion and activation on a shielded plasma gradient prepared on polyethylene. *Biomaterials* 23: 757–766.

- Trepap X, Lenormand G, Fredberg JJ (2008) Universality in cell mechanics. *Soft Matter* 4: 1750–1759.
- Théry M, Pépin A, Dressaire E, Chen Y, Bornens M (2006) Cell distribution of stress fibres in response to the geometry of the adhesive environment. *Cell Motil* 63: 341–355.
- Vesel A, Mozetic M, Jaganjac M, Milkovic L, Cipak A, Zarkovic N (2011) Biocompatibility of oxygen-plasma-treated polystyrene substrates. *Eur Phys J Appl Phys* 56: 240-246.
- Vogler EA, Graper JC, Harper GR, Sugg HW, Lander LM, Brittain WJ (1995) Contact activation of the plasma coagulation cascade I Procoagulant surface chemistry and energy. *J Biomed Mater Res* 29: 1005–1016.
- Wang J, Chen JY, Yang P, Leng YX, Wan GJ, Sun H, Zhao AS, Huang N, Chu PK (2006) In vitro platelet adhesion and activation of polyethylene terephthalate modified by acetylene plasma immersion ion implantation and deposition. *Nucl Instrum Methods Phys Res Sect B Beam Interact Mater Atoms* 242: 12–14.
- Wang H, Ji J, Zhang W, Wang W, Zhang Y, Wu Z, Zhang Y, Chu PK (2010) Rat calvaria osteoblast behavior and antibacterial properties of O₂ and N₂ plasma-implanted biodegradable poly(butylene succinate). *Acta Biomater* 6: 154–159.
- Xu LC, Siedlecki CA (2007) Effects of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces. *Biomaterials* 28: 3273–3283.
- Xu LC, Vadillo-Rodriguez V, Logan BE (2005) Residence time loading force pH and ionic strength affect adhesion forces between colloids and biopolymer-coated surfaces. *Langmuir* 21: 7491–7500.
- Yanagisawa I, Sakuma H, Shimura M, Wakamatsu Y, Yanagisawa S, Sairenji E (1989) Effects of “wettability” of biomaterials on culture cells. *J Oral Implantol* 15: 168–177.

12. Modele opracowywania systemów dostarczania leków

Models for developing drug delivery systems

Kacper Przykaza

Katedra Zjawisk Międzyfazowych, Instytut Nauk Chemicznych,
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Plac Marii Curie-Skłodowskiej 3, 20-031 Lublin
Opiekun naukowy: dr hab. Agnieszka Ewa Wiącek, prof. UMCS

Kacper Przykaza: przykaza.kacper@poczta.umcs.lublin.pl

Słowa kluczowe: systemy dostarczania leków, nowe technologie

Streszczenie

Systemy dostarczania leków (ang. Drug Delivery Systems (DDS)) to preparaty, mikro- lub nanomateriały, które umożliwiają wprowadzanie substancji terapeutycznej do organizmu w taki sposób, aby poprawić jej skuteczność i bezpieczeństwo poprzez kontrolowanie szybkości, czasu i miejsca uwalniania w ustroju. Obecnie technologia ta rozwija się bardzo szybko łącząc ze sobą wiele gałęzi nauk pokrewnych takich, jak: biotechnologia, chemia materiałów, medycyna, czy farmakologia. Głównym celem intensywnych badań jest opracowanie optymalnego systemu dostarczania substancji, który umożliwi jej kontrolowane uwolnienie, wchłanianie lub późniejszy transport przez błony biologiczne do docelowego miejsca działania. W niniejszej pracy przeglądowej opisano historię oraz modele systemów dostarczania leków, ich wady i zalety, podatność na modyfikacje oraz dalsze perspektywy rozwoju tego typu układów.

1. Wstęp oraz rys historyczny

Celem opracowania i stosowania systemów terapeutycznych DDS jest leczenie chorób w sposób spójny i przewidywalny. Zakłada się, że dla odpowiedniego czasu trwania terapii istnieje korelacja między optymalnym stężeniem środka aktywnego w miejscu docelowym a uzyskaniem maksymalnego efektu farmakologicznego. Zmodyfikowane i / lub kontrolowane uwalnianie substancji terapeutycznej przynosi natychmiastowe korzyści, dzięki czemu leczenie jest bardziej skuteczne. Ponadto, DDS cieszą się również dużym zainteresowaniem ze względu na fakt, że można je wykorzystać do zwiększenia skuteczności i użyteczności leków starszych generacji. Technologia kontrolowanego uwalniania substancji była już wykorzystywana do modyfikacji szlaków metabolicznych wielu środków aktywnych biologicznie, a nawet genów (Yun i in. 2014). Naukowcy podjęli wiele wysiłków, aby osiągnąć właściwą modulację dostarczania takich substancji, a w ciągu ostatnich siedmiu dekad technologia dostarczania leków znacznie się rozwinęła. Badania w tej dziedzinie są trudne i kosztowne, ze względu na obowiązujące przepisy patentowe dla stosowanych od wielu lat substancji terapeutycznych. Na szczęście wiele koncernów farmaceutycznych przyczyniło się do przyspieszenia prac, ponieważ odsetek leków zawierających nowe substancje aktywne stale się zmniejsza, tych generujących ogromne koszty wymagane do wprowadzenia na rynek nowych odpowiedników. Jednakże rozwój systemów dostarczania leków jest niezwykle złożony i wymaga podejścia wielobiegunowego. Rozwój technologii DDS jest procesem stosunkowo wolnym biorąc pod uwagę inne gałęzie i trwa już ponad 70 lat. Wynika to z potrzeby zrozumienia i opisanego farmakokinetycznego rozmieszczenia danego leku w organizmie człowieka (lub zwierzęcia), co kolejno determinuje wstępne opracowanie i badanie systemów kontrolowanego uwalniania substancji czynnych w ustroju (Ritschel 1988). Na początku XX wieku era badaczy tzw. ‘botaników’ zaczęła zmieniać swój podstawowy warsztat badawczy na rzecz bardziej nowoczesnego podejścia opartego na rozwoju chemii syntetycznej. Po II wojnie światowej stan wiedzy biomedycznej uległ gwałtownej poprawie, ponieważ większość opracowanej technologii wojskowej została przekierowana na medycynę. Równocześnie nastąpił szybki rozwój elektroniki i nowych materiałów, przez co opracowano i stworzono wiele skomplikowanych urządzeń badawczych i pomiarowych, które okazały się niezbędne dla dalszego stale rosnącego tempa rozwoju DDS (Stigi 1988). Obecnie celem naukowców jest opracowanie bardzo precyzyjnych biologicznie DDS o równie

precyzyjnie kontrolowanym uwalnianiu. Historia pokazuje jednak, że strategie kontroli uwalniania leku z systemów terapeutycznych przeszły z epoki makro-, mikro- i nanopolimerowej do ery biologicznej. Pierwsze próby modyfikacji uwalniania substancji czynnej obserwowano wraz z rozwojem procedury otrzymywania tabletek powlekanych. Początkowo miały one na celu jedynie zamaskowanie nieprzyjemnego smaku substancji terapeutycznej. Stosowano wtedy materiały zawierające jony metali lekkich i w ten sposób zaobserwowano opóźnienie uwalniania leku. Już w latach 1940–1950 powstały pierwsze zmodyfikowane systemy DDS, były to pastylki doustne o właściwościach uwalniających dawkę środka aktywnego w żołądku i kolejną dawkę w jelicie cienkim lub uwalniały całą dawkę leku dopiero w jelicie z pominięciem żołądka. Niestety pierwsze układy DDS były bardzo podatne na zmienne fizjologiczne takie, jak: pH treści pokarmowej, soków trawiennych, czy ilość pokarmu w żołądku. Postęp w strategiach kontroli i uwalniania leku z systemów farmaceutycznych dokonany w ciągu ostatnich 70 lat jest znaczący. Analizując ponad 20 strategii modyfikacji uwalniania leków z DDS, można podzielić ich ewolucję na dwie główne grupy. Pierwsza z nich składa się z wiedzy uzyskanej do lat 70 XX wieku, w której znajdują się podstawy kontrolowanego uwalniania leku (Yun i in. 2014):

- Badanie właściwości fizykochemicznych: rozpuszczania, dyfuzji, osmozy i wymiany jonowej wpływających na mechanizm dostarczania leku,
- Podawanie doustne ze zmniejszoną liczbą dawek (jeden raz dziennie zamiast dwa lub trzy razy dziennie),
- Podawanie podskórne ze zmniejszoną liczbą dawek (jeden lub dwa razy w tygodniu zamiast jeden raz dziennie).

Drugą grupę stanowi wiedza uzyskana od połowy lat 80 XX wieku do pierwszej dekady XXI wieku, kiedy to narodziła się koncepcja inteligentnych systemów dostarczania leków. Jej główne założenia to: kolejność uwalniania, hydrożele i inteligentne polimery, jako nośniki substancji bioaktywnych, dostarczanie peptydów i białek, systemy nanostrukturalne i materiały biodegradowalne (Yun i in. 2014). Przyszłość systemów inteligentnego dostarczania leków jest trudna do przewidzenia. Obecnie na rynku farmakologicznym pojawia się coraz więcej leków nowej generacji typu biomolekularnego o minimalnych skutkach ubocznych, które w połączeniu z DDS bazującymi na kontrolowanym i zoptymalizowanym uwalnianiu, mogą zrewolucjonizować ten rynek sprawiając, że DDS staną się bardziej biologiczne i mniej zależne od stosowanych mikro-, czy nanomateriałów.

2. Modele wytwarzania i modyfikacji inteligentnych systemów dostarczania leków

Podawanie substancji czynnej w chorobie ma na celu przede wszystkim umożliwienie działania zgodnego z jej przeznaczeniem. Często konwencjonalne schematy terapeutyczne opierają się na stosowaniu dużej ilości substancji terapeutycznej, gdzie znaczna jej część jest wydalana bez wywierania efektu terapeutycznego. Zgodnie z definicją, modyfikowanie uwalniania leku oznacza, że przebieg tego procesu dla danej substancji czynnej będzie różnił się od uwalniania tradycyjnego. Dlatego też zmodyfikowana dawka uwolnionego leku charakteryzuje się odpowiednimi właściwościami uwalniania leku w czasie i / lub zmianie lokalizacji w celu osiągnięcia efektów terapeutycznych lub wygody stosowania, które nie były możliwe podczas stosowania form konwencjonalnych (Pereira i in. 2013). W ujęciu stosowanym dla inteligentnych systemów dostarczania leków, środkiem terapeutycznym może być również terapia genowa, która indukuje wytwarzanie aktywnego środka terapeutycznego *in vivo*. Pomimo faktu, że leczenie tego typu musi być kontrolowane w najwyższym stopniu, wektory genowe wymagają wprowadzenia do organizmu ludzkiego z wykorzystaniem nowych metod (Jain 2008). Biorąc ten fakt pod uwagę kontrola czasowa i przestrzenna w kontekście uwalniania leków stanowi główny cel ich monitorowanego dostarczania z różnych układów. W systemach o natychmiastowym uwalnianiu szybkość pojawienia się leku w organizmie jest kontrolowana przez proces wchłaniania biologicznego, podczas gdy w układach o przedłużonym uwalnianiu jest to kontrolowane również poprzez postać dawki. W rozumieniu tego, zawiesiny, emulsje, kapsułki i tabletki mogą być modyfikowane według strategii uwalniania leku z DDS. Jednak celem stosowania DDS jest co najmniej 2-krotne zmniejszenie częstotliwości

dawkowania, a w większości przypadków podejmowane są próby opracowania dawkowania leku jeden raz dziennie, dla wszystkich dróg podawania (Longer i in. 1988). Podsumowując, aby szybko osiągnąć stężenie terapeutyczne leku w organizmie, a następnie utrzymać to stężenie przez określony czas, konieczne jest, aby całościowa dawka substancji aktywnej w strukturze DDS składała się z dwóch mniejszych porcji: jednej zapewniającej i wymuszającej osiągnięcie stężenia tkankowego leku gwarantującego początkowy efekt terapeutyczny, a druga dawka powinna zapewniać podtrzymanie tego efektu. Jest ona uwalniana z małą, ale określoną szybkością (zgodnie z kinetyką zerowego rzędu) podtrzymując efekt pierwotny. Ponadto szybkość uwalniania dawki podtrzymującej z dawki pierwotnej, a zatem wprowadzania leku do ustroju, musi być równa szybkości metabolizowania i wydalania leku z organizmu, w momencie, gdy stężenie leku w organizmie utrzymuje się na optymalnym poziomie terapeutycznym. Biorąc powyższe pod uwagę bardzo trudno jest opracować idealną modyfikację systemu dostarczania leków. Warunki fizjologiczne związane z miejscem podania i stałą szybkości metabolizmu danej substancji różnią się znacznie w zależności od wieku, płci i innych cech osobowościowych pacjenta, dlatego mogą przyczynić się do błędnego i nieprecyzyjnego dawkowania. W efekcie tego wiele systemów o zmodyfikowanym uwalnianiu nie jest idealną formą rozprowadzania leku (Collett i Moreton 2001).

Wraz ze wzrostem zainteresowania dostarczaniem leków o przedłużonym uwalnianiu narodziła się koncepcja systemów kontrolowanego uwalniania, łącząca doskonałą wydajność, wysoce przewidywalną kontrolę nad schematem uwalniania oraz opóźnioną zawartość substancji w tkankach lub krwi. Idea ta opiera się na prostym modelu jednopodziałowym, gdzie uwolniona z układu DDS dawka powinna być równoważna podanej dożylnie dawce leku (tzw. dostarczenie zerowego rzędu). Ta analiza zakłada, że zarówno farmakokinetyka jak, i farmakodynamika danej substancji jest taka sama. Założenie to jednak nie jest zawsze spełnione, np. dla peptydów i białek. Ponadto zakłada, że zakłócenia biologiczne są na tyle małe, że dostarczanie zerowego rzędu można odróżnić od innych funkcji wejściowych na podstawie zmian ich farmakokinetyki. Niestety, optymalna szybkość wprowadzania różnych substancji czynnych dla konkretnych stanów chorobowych nie jest taka sama. Na przykład wiadomo, że rytm okołodobowy wpływa na zmiany stężenia enzymów i hormonów we krwi, co może zmieniać wiązanie substancji aktywnej z białkami oraz jej metabolizm (Longer i in. 1988). Wybór i zastosowanie skutecznego układu DDS zależy od właściwości fizykochemicznych i biofarmaceutycznych danej substancji czynnej oraz pożądanego profilu stężenia w osoczu lub w miejscu działania (Maurin i in. 2006). Głównym celem ich stosowania jest zmniejszenie lokalnych lub ogólnoustrojowych skutków ubocznych oraz wyleczenie bądź kontrola stanu patologicznego w możliwie najkrótszym czasie, dodatkowo przy użyciu jak najmniejszej ilości substancji czynnej. Naturalne bariery biologiczne ssaków wyższych są wyzwaniem dla pomyślnego stosowania DDS. Ponadto, powodzenie użycia DDS zależy również od reakcji organizmu w miejscu podania, innymi słowy układy DDS powinny charakteryzować się wysoką biokompatybilnością wobec żywych tkanek. W związku z tym należy wziąć pod uwagę wszelkie bariery absorpcyjne i metaboliczne, które mogą występować w miejscu podania. Tu należy zauważyć, że inne drogi dostarczania i rozprowadzania leków w momencie, gdy podanie doustne nie jest możliwe mogą zapewnić odpowiednią biodostępność substancji czynnej oraz jej właściwy profil stężeniowy w czasie (Maurin i in. 2006). Dlatego zmiany w oczekiwanych szybkościach wchłaniania, dystrybucji, metabolizmu lub wydalania substancji aktywnych biologicznie są bezpośrednio skorelowane z drogą podania, a fakt ten musi być brany pod uwagę przy projektowaniu i produkcji DDS. Głównymi czynnikami biologicznymi, które wpływają na proces działania leku na organizm, a tym samym na wydajność DDS w zależności od drogi podania są:

1. Przy podaniu podpolicykowym lub podjęzykowym - rozpuszczanie i rozcieńczanie substancji śliną oraz miejscowe zmiany ukrwienia i rogowacenia błony śluzowej,
2. Przy podaniu doustnym - pH treści żołądka i treści pokarmowej,
3. Przy podaniu dojelitowym - perystaltyka jelit, metabolizm pierwszego przejścia (wątrobowy), obecność i stężenie wydzielanych enzymów, rodzaj i ilość obecnych bakterii, przepuszczalność błon oraz wydajność mechanizmów transportu substancji do krwioobiegu,

4. Przy podaniu podskórnym - stopień przepuszczalności tkanek, wystąpienie reakcji alergicznych i pojawienie się stanów patologicznych, możliwe wiązanie substancji terapeutycznych w naskórku,
5. Przy podaniu domięśniowym - biogodność, stopień zajęcia układu siateczkowo-śródbłonkowego przy iniekcji, procesy metaboliczne zachodzące w mięśniach, drożność naczyń krwionośnych oraz ewentualny przepływ limfy (Longer i in. 1988).

3. Zalety i wady systemów dostarczania leków

W XX wieku farmacja zajmowała się teorią i praktyką wytwarzania postaci dawkowania na małą i dużą skalę oraz przygotowywaniem preparatów do terapii genowych (Florence 2011). Postęp w naukach materiałowych, a szczególnie rozwój kapsułkowania leków poskutkowało opracowaniem doustnych systemów dostarczania oraz szeroką gamą materiałów do dalszego opracowywania systemów mikro- lub nanostrukturalnych. Ponadto rozwój nanotechnologii przyczynił się do sprawnego określania specyficznego zachowania DDS *in vivo* oraz dał możliwości ich udoskonalania. Aktualny stan wiedzy i technologii umożliwił wdrożenie koncepcji inteligentnego systemu terapeutycznego pozwalającego optymalnie dawkować / uwalniać konkretną kompozycję, która składa się z jednego lub więcej leków, w sposób ciągły zgodnie z określonym schematem przez określony czas, bądź pulsacyjnie, w sposób ogólnoustrojowy, albo docelowy (do konkretnego narządu lub tkanki) (Jones i in. 2009). W rezultacie DDS może zapewnić jedną lub więcej z następujących korzyści:

- Kontrolowane podawanie dawki terapeutycznej leku z pożądaną szybkością uwalniania,
- Utrzymanie stężenia leku w optymalnym zakresie terapeutycznym przez odpowiedni czas leczenia,
- Optymalizację zależności między skutecznością a dawką,
- Ograniczenie kumulowania się substancji czynnej w organizmie,
- Ograniczenie niepożądanych skutków ubocznych,
- Ochronę substancji czynnej przed niepożądaną degradacją w płynach ustrojowych,
- Minimalizację zużycia substancji aktywnej w skali globalnej,
- Zmniejszenie częstotliwości przyjmowania leku,
- Ciągłe leczenie bez nocnego podawania,
- Zmniejszenie ryzyka pominięcia dawki w leczeniu (Chien 1992).

Rynek systemów kontrolowanego dostarczania leków niewątpliwie budzi duże zainteresowanie. Wiele publikacji i znaczna liczba badań naukowych wygenerowały liczne strategie rozwoju i modyfikacji tych układów, które mają na celu optymalizację kontrolowanego uwalniania czynnika aktywnego w miejscu docelowym. Opracowano metody mechaniczne, fizykochemiczne i chemiczne do obserwacji zarówno dostępu, jak i biodostępności środka aktywnego w miejscu działania. Niestety, podobnie jak inne technologie ingerujące w procesy farmakologiczne zachodzące w żywym organizmie, DDS posiadają pewne wady, takie jak:

- Trudność (lub wręcz niemożność) szybkiego przerwania działania farmakologicznego substancji w przypadku wystąpienia szoku anafilaktycznego (reakcji alergicznej), bądź nietolerancji leku,
- Ryzyko kumulacji leku w przypadku upośledzonej szybkości eliminacji z ustroju,
- W przypadku podania doustnego działanie może być zależne od ilości pokarmu w żołądku i jelitach,
- Słaba lub zerowa skuteczność w przypadku trudności z wchłanianiem,
- Kinetyka uwalniania zależy od integralności postaci dawki,
- Rozmiar preparatu (czasami bardzo duży),
- Czasami słaba biodostępność,
- Wyższe koszty produkcji w porównaniu z preparatami konwencjonalnymi.

4. Podsumowanie

Podsumowując, aby stworzyć idealny, kontrolowany układ DDS nie powinien być on wysoce wrażliwy na czynniki środowiskowe, a jego działanie powinno być przewidywalne. Musi również być kompatybilny z różnymi środkami aktywnymi, posiadać zdolność do zwiększania lub przynajmniej utrzymywania fizyko-chemicznej stabilności tejże substancji, zapewniać maksymalną wydajność, bezpieczeństwo i niezawodność. Mimo posiadania ogromnej wiedzy i zaawansowanej technologii, naukowcy nadal nie opracowali optymalnego systemu dostarczania substancji terapeutycznych. Dalszy rozwój tej gałęzi nauki jest nadal ogromnie ważny dla cywilizacji ludzkiej, ponieważ w skali globalnej przyczyni się do poprawy jakości życia wielu milionów pacjentów na całym świecie, skracając cierpienie podczas choroby, oraz znacznie zmniejszając czas hospitalizacji.

5. Literatura

- Bruschi ML, Jones D, Panzeri H, Gremião MPD, De Freitas O, Jones DS (2008) Precursor system of liquid crystalline phase containing propolis microparticles for the treatment of periodontal disease: Development and characterization. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 34, 267–278.
- Bruschi ML, Jones D, Panzeri H, Gremião MPD, De Freitas O, Lara EH (2007) Semisolid systems containing propolis for the treatment of periodontal disease: in vitro release kinetics, syringe ability, rheological, textural, and mucoadhesive properties. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96(8), 2074–2089.
- Chien, Y. W. (1992). *Novel drug delivery systems* 20-26. New York: Marcel Dekker.
- Collett J, Moreton C (2001). Modified-release peroral dosage form. *Pharmaceutics: The science of dosage form design*. 289–306. London: Churchill Livingstone.
- Jain KK (2008). Drug delivery systems – An overview. *Drug delivery systems* 1–50. New York: Marcel Dekker.
- Jones DS, Bruschi ML, De Freitas O, Gremião MPD, Lara EHG (2009) Rheological, mechanical and mucoadhesive properties of thermoresponsive, bioadhesive binary mixtures composed of Poloxamer 407 and Carbopol 934P designed as platforms for implantable drug delivery systems for use in the oral cavity. *International Journal of Pharmaceutics*, 372, 49–58.
- Longer MA, Middleton DL, Robinson JR (1988) Conventional routes of delivery and the need for devices. *Drug delivery devices: Fundamentals and applications* 3–16. New York: Marcel Dekker.
- Maurin MB, Hussain AA, Dittert LW (2006). Dosage form design: a physicochemical approach. *Encyclopedia of pharmaceutical technology* 939–947. New York: Informa Healthcare
- Pereira RRA, Godoy JSR, Svidzinski TIE, Bruschi ML (2013). Preparation and characterization of mucoadhesive and thermoresponsive systems containing propolis for the treatment of vulvovaginal candidiasis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 102(4), 1222–1234.
- Ritschel WA, (1988) Pharmacokinetic and biopharmaceutical aspects in drug delivery. *Drug delivery devices: Fundamentals and applications* 17–80. New York: Marcel Dekker.
- Stigi JF, (1988) The regulation of drug delivery devices. *Drug delivery devices: Fundamentals and applications* 81–133. New York: Marcel Dekker.
- Yun Y, Lee BK, Park K (2014) Controlled drug delivery systems: the next 30 years. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 8(3), 276–279.

13. Biosurfaktanty bakteryjne a tworzenie biofilmu

Bacteria biosurfactants and biofilm formation

Rekiel Edyta

Katedra Zjawisk Międzyfazowych, Instytut Nauk Chemicznych, Wydział Chemii,
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin
Opiekun naukowy: prof. dr hab. Anna Zdziennicka

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

Słowa kluczowe: biosurfaktanty, bakterie, biofilm

Streszczenie

Surfaktanty to niezwykle ważne substancje obecne w życiu człowieka niemal na każdym kroku. Stosuje się je w różnego rodzaju przemysłach i często nawet nie zdajemy sobie sprawy z tego jak wiele razy je spotykamy. Związki powierzchniowo czynne obecne są w produktach spożywczych, kosmetykach i farmaceutykach, a także w szczepionkach i niektórych lekach. Ich amfifilowa budowa, czyli struktura składająca się z części hydrofilowej i hydrofobowej, pozwala na solubilizację cząsteczek o różnej polarności. Oczywiście, surfaktanty jako związki syntetyczne nie pozostawiają środowiska bez wpływu, powodując nieodwracalne zmiany zarówno w faunie jak i florze. Tym samym, wielu producentów sięga po bardziej ekologiczne rozwiązania. Szukają oni naturalnych substancji o tych samych lub nawet lepszych właściwościach, zdolnych do zastąpienia syntetyków. Najbardziej popularnymi biosurfaktantami są te produkowane naturalnie przez różne szczepy bakterii, grzyby i drożdże. Biosurfaktanty są przyjazne dla środowiska, można je otrzymywać z materiałów odpadowych, szczególnie olejów i pozostałości ropy naftowej. Wiele gatunków bakterii produkuje również wyspecjalizowane enzymy pozwalające na biodegradowalność wytwarzanych przez siebie substancji. Biosurfaktanty są mniej toksyczne lub zupełnie nietoksyczne, mają specyficzne właściwości takie jak przeciwbakteryjność, przeciwwirusowość lub przeciwgrzybiczość, wiele z nich ma działanie antybiotyczne.

1. Wstęp

Biosurfaktanty zawierają szeroką gamę struktur chemicznych: lipopetydów, glikolipidów, kompleksów białkowych i polisacharydowych, kwasów tłuszczowych, fosfolipidów i lipidów obojętnych. Produkcja biosurfaktantów uznawana jest za jedną z kluczowych technologii dwudziestego pierwszego wieku i należy do „zielonej chemii”. Ich biodegradowalność i niska toksyczność sprawiają, że są one atrakcyjne w wielu gałęziach przemysłowych. Można je spotkać nie tylko w farmaceutykach i kosmetykach (np. w dezodorantach, pastach do zębów, płynach do soczewek czy odżywkach), ale również w przemyśle spożywczym, cukierniczym, rolnictwie, włókiennictwie, przemyśle papieru i petrochemii. Stosuje się je jako konserwanty i związki emulgujące. Biosurfaktanty znajdują zastosowanie w antybiotykach, środkach przeciwnowotworowych do leczenia raka płuc, guzów mózgu i białaczki. (Krzyczkowska i Białeczka-Florjańczyk, 2012). Poza wysoką biodegradowalnością, biosurfaktanty wyróżniają się stabilnością w szerokim zakresie pH, zasoleniu środowiska, mają wysoką selektywność i krytyczne stężenie micelizacji (CMC) niższe niż klasycznych surfaktantów. Są naturalnie produkowane przez mikroorganizmy, a najbardziej efektywne biosurfaktanty mogą obniżyć napięcie powierzchniowe wody do 30 mN/m. Aktywność danego biosurfaktantu zależy mocno od jego stężenia. Kiedy biosurfaktant osiąga wartość CMC, w roztworze zaczynają tworzyć się micelle, biwarstwy oraz pęcherzyki. Micelizacja pozwala biosurfaktantom obniżyć napięcie powierzchniowe i międzyfazowe, a to z kolei pozwala na rozpuszczanie związków hydrofobowych we wnętrzu tworzących się micel (Pacwa-Płociniczak 2011).

2. Opis zagadnienia

Biosurfaktanty mają działanie przeciwwirusowe, przeciwgrzybiczne i przeciwbakteryjne, co sprawia, że są bardzo użyteczne w zastosowaniach medycznych i terapiach. Ich antyadhezyjne

właściwości dotyczące kilku gatunków patogenów mogą być bardzo przydatne w pokrywaniu materiałów wykorzystywanych do tworzenia implantów. Mogłoby to zdecydowanie zmniejszyć ilość szpitalnych infekcji bez dodatkowych kosztów związanych z zakupem związków chemicznych lub syntetyków przeciwdziałających zakażeniom. W zależności od gatunku, biosurfaktanty wykazują różne fizjologiczne funkcje i właściwości. Zmieniając substraty lub warunki hodowli danego organizmu, można wpływać na ich zastosowania. Biosurfaktanty są uznawane za metabolity wtórne, mogą przyspieszać transport składników odżywczych i zachowywać się jak biocydy, a także zwiększać biodostępność substancji hydrofobowych czy wiązać metale ciężkie. Dodatkowo, mają swój udział w patogenezie bakterii i tworzeniu biofilmów.

Wiele cząsteczek organicznych ma tendencję do zatrzymywania na powierzchniach ciał stałych praktycznie dla wszystkich układów. Mogą tworzyć film, który zmienia właściwości danej powierzchni: jej energii powierzchniowej i zwilżalności. W ten sposób, biosurfaktanty mają wpływ na adhezję bakterii i ich ewentualne sukcesywne odrywanie.

Adhezja i dalszy wzrost bakterii na implantach biomedycznych i narzędziach wykorzystywanych do operacji powoduje wzrost biofilmu, którego, tak zwany, „glikokaliks” osadza bakterie wywołujące infekcje, jednocześnie oferując im ochronę przed przeciwciałami i antybiotykami. Większość naturalnie występujących powierzchni międzyfazowych ma ujemny ładunek. pH i warunki jonowe są bardzo ważne by przewidzieć interakcje między powierzchnią międzyfazową, a biosurfaktantami. Gottenbos i współpracownicy (Gottenbos et al. 2001) badając powierzchnie o ładunkach pozytywnych stwierdzili, że mają one przeciwbakteryjne właściwości w przypadku przylegania bakterii Gram-ujemnych. Podobny efekt nie został zaobserwowany dla bakterii Gram-pozytywnych. Jak wcześniej wspomniano, struktura biosurfaktantu będzie wpływać na jego właściwości i zachowanie na powierzchniach międzyfazowych. Układy naturalne są bardzo skomplikowane i aby dobrze je opisać, należy wziąć pod uwagę wiele różnych czynników. Adhezja jest jedynie pierwszym z wielu kroków prowadzących do infekcji wywołanej biofilmem i aby taki biofilm mógł powstać, bakterie muszą zająć konkretną niszę i mieć możliwość wzrostu. Brak wzrostu na powierzchniach dodatnio naładowanego poli(metakrylanu metylu) dla bakterii mających zdolność do przylegania z gatunku *Escherichia coli* został opisany przez Harkesa i współpracowników (Harkes i in. 1992). Barton i współpracownicy (Barton i in. 1996) przeprowadzili badania nad wzrostem bakterii *Pseudomonas aeruginosa* i wpływu swobodnej energii powierzchniowej. Takiego wpływu nie zaobserwowano dla *Staphylococcus epidermidis* i *E. coli*. Gottenbos i współpracownicy (Gottenbos i in. 2000) badali z kolei wzrost *Pseudomonas aeruginosa* na powierzchniach biomateriałów i stwierdzili, że wzrost ten spadał wraz ze wzrostem siły z jaką bakterie przylegały do powierzchni.

Lipopeptydy są jedną z głównych grup biosurfaktantów i charakteryzują się wysoką aktywnością powierzchniową i właściwościami antybiotycznymi. Mogą zachowywać się jak czynniki antynowotworowe i antywirusowe, antybiotyki, inhibitory enzymów i toksyn, a także czynniki stymulujące układ odpornościowy. Surfaktyna jest bardzo skuteczna w modyfikowaniu hydrofobowego charakteru powierzchni pokrytej przez *Bacillus subtilis*. Ten aspekt był niezwykle ważny przy kontroli chorób roślin i ogólnie przy właściwościach antygrzybiczych. Jest ona lipopeptydem charakteryzującym się budową cykliczną (Meena i Kanwar 2015). Potrafi wchodzić w interakcje z bio-membranami i układami składającymi się z otoczonych wirusów oraz protoplastów bakteryjnych. *Bacillus subtilis* jest w stanie produkować trzy typy surfaktyny: A, B i C, które różnią się między sobą sekwencją aminokwasów. Bakterie ze szczepu *Bacillus* należą do rodziny *Bacillaceae*, która zawiera siedemnaście gatunków. Są często spotykane w środowisku naturalnym i są typowymi saprofitami żyjącymi w ziemi oraz wodzie. Bakterie te są Gram+, mezofilne, ruchliwe i należą do grupy neutrofilii. Ich charakterystyczną cechą jest fakt, że potrafią tworzyć endospory. *Bacillus subtilis* potrafi produkować duże ilości polipeptydowych antybiotyków, enzymów zewnątrzkomórkowych (np. hydrolazy, która depolimeryzuje substancje makrocząsteczkowe), toksyn i innych metabolitów. *Bacillus subtilis* ma ogromne właściwości adaptacyjne w zmiennych warunkach środowiskowych – zarejestrowano jej wzrost nawet w temperaturach sięgających siedemdziesięciu stopni. Tym samym, bakteria ta jest czasami nazywana „termotolerantem”. Badania

wykazują, że *Bacillus subtilis* nie ma wyspecjalizowanych mechanizmów kolonizacyjnych (Kozajda i Szadkowska-Stańczyk, 2012).

Surfaktyna posiada zróżnicowane właściwości, ale przede wszystkim może hamować formowanie się zakrzepu fibrynowego, tworzenie kanałów w błonach (szczególnie w podwójnych błonach) i hamowanie adenozyno-5'-monofosforanu, który reguluje wiele komórkowych procesów metabolicznych, np. metabolizm ADP/ATP (adenozyno-5'-difosforanu/adenozyo-5'-trifosforanu). Co więcej, surfaktyna hamuje fosfolipazy ludzkiej śledziony i hamuje płytki krwi. Kim i współpracownicy (Kim K i in. 1998) zbadali ten lipopetydowy biosurfaktant wykazując, że jest on selektywny wobec konkretnej fosfolipazy śledziony i może być uznany za czynnik przeciwzapalny ze względu na zachodzącą bezpośrednio reakcję. Vollenbroich i współpracownicy (Vollenbroich i in. 1997) stwierdzili, że surfaktyna może zmieniać morfologię komórek przez wzrost szybkości proliferacji, szczególnie komórek, które mają kontakt z mikoplazmą. Daje to możliwość dezaktywacji komórek mikoplazmy bez wpływu na ich ogólny metabolizm.

Surfaktyna wykazuje aktywność przeciwko różnorodnym wirusom, takim jak wirusy opryszczki (HSV-1 i HSV-2), wirus Sempliki Forest, wirus VSIV (Indiana vesiculovirus), wirus zapalenia mózgu, małpi wirus niedoboru odporności, czy kalciwirus koci (Rodrigues i in. 2006). Surfaktyna jest bardziej skuteczna w dezaktywacji opakowanych wirusów (retrowirusów, wirusów opryszczkowych), które mogą wchodzić w interakcje z fizyko-chemiczną naturą surfaktantu i niektórymi zewnętrznymi częściami w lipidowej błonie podwójnej warstwy wirusa. Powoduje to zwiększenie przepuszczalności przy wyższych stężeniach i prowadzi do dezintegracji błony mikoplazmy.

Jako biosurfaktant, surfaktyna może mieć zarówno dobry jak i zły wpływ na środowisko, w którym się znajduje. *Bacillus* może produkować surfaktynę ze względu na kilka czynników. Przede wszystkim zwraca się uwagę na jej antywirusowe i przeciwbakteryjne działanie ze względu na zdolność do penetracji błon komórkowych różnego rodzaju bakterii. Potrafi działać i dezaktywować opakowane wirusy, a także doprowadzać do lizy komórki, szczególnie tych pochodzenia zwierzęcego i zwiększać możliwość wystąpienia hemolizy (Rodrigues i in. 2006).

Glikolipidy są jednymi z najbardziej powszechnych biosurfaktantów i są znane jako najbardziej skuteczne. Isoda i współpracownicy (Isoda i in. 1997) przeprowadzili badania na glikolipidach i wywnioskowali, że oprócz rhamnolipidu, reszta biosurfaktantów z grupy glikolipidów powodowała różnicowanie komórek zamiast ich proliferacji. Badanie zostało przeprowadzone na linii HL60 komórek białaczki promielocytowej.

Rhamnolipidy składają się z jednej lub dwóch cząsteczek cukru ramnozy i cząsteczki kwasu tłuszczowego. Ich przeciwbakteryjne właściwości są szeroko opisane w literaturze. Zidentyfikowano siedem rhamnolipidów otrzymanych z *Pseudomonas aeruginosa* AT10. Pochodziły one z odpadów ropy naftowej i wykazywały silne właściwości przeciwgrzybicze (Abalos i in. 2001). Rhamnolipidy mogą być podzielone na mono- i dirhamnolipidy. Niektóre bakterie znane są z produkowania tylko monorhamnolipidów, część produkuje oba związki. Stosunek mono- i dirhamnolipidów jest wysoko zależny od użytych metod produkcji. Pozwala to również na kontrolę produkcji do pewnego stopnia z wykorzystaniem enzymów, które mogą przekształcić monorhamnolipidy w dirhamnolipidy. Rhamnolipidy mają wiele zastosowań: np. odzysk olejów, bioremediacja, produkcja farmaceutyków, czynniki terapeutyczne, kosmetyki i środki czyszczące (Kandjeet i Pattanathu 2014).

Pseudomonas aeruginosa jest największym producentem rhamnolipidu, ale ze względu na jego patogeniczność, trudno mówić o produkcji na wysoką skalę. Bakteria ta jest Gram-oportunistyczną bakterią, która może powodować infekcje. Jest obecna zarówno w środowisku wodnym jak i w ziemi, jest w stanie skolonizować wiele powierzchni o różnym pochodzeniu. Infekcje spowodowane tą bakterią mogą być bardzo przewlekłe i mogą zagrażać życiu wielu organizmów. Mogą powodować infekcje szpitalne. *Pseudomonas* posiada determinanty swojej zjadliwości i sieć wewnątrzkomórkową sygnałów regulatorowych, która pozwala mu na kolonizację lub ucieczkę przed układem odpornościowym gospodarza. (Klockgether i Tümmler 2017).

Powodów, dla których *Pseudomonas aeruginosa* produkuje rhamnolipid jest kilka i do tej pory pozostają one przedmiotem spekulacji. Wymienia się tu najczęściej zwiększanie hydrofobowości bakterii w odpowiednich warunkach, działanie przeciwbakteryjne

i przeciwgrzybiczne, jako przewagę dla bakterii w konkurowaniu o najbardziej korzystną niszę, wpływ na zjadliwość i tym samym patogeniczność *Pseudomonas aeruginosa*. Rhamnolipid wpływa również na ruchliwość bakterii i formowanie biofilmu (Chrzanowski i in. 2012).

Wiele infekcji, szczególnie tych związanych z wenflonami dożylnymi, kateterami krtaniowymi i cewnikami moczowymi, czy też prostetycznymi zastawkami lub różnymi implantami ortopedycznymi, może powodować powstawanie biofilmów. W najgorszym wypadku biofilm może stać się odporny na działanie układu odpornościowego gospodarza. Bez dwóch zdań jest to poważny problem dla inżynierii medycznej oraz współczesnej medycyny. Wiedza na temat użytkowania biosurfaktantów oraz na temat ich modyfikacji wprowadza cień nadziei w pokonaniu odporności bakteryjnej. Biosurfaktanty znane są ze swoich właściwości przeciwadhezyjnych w przypadku organizmów patogennych. Mogą stać się efektywnymi czynnikami pożytecznymi w walce z mikroorganizmami oraz ich zdolnością do zajmowania korzystnych nisz. W wyniku użycia roztworu surfaktyny i obmycia w nim winylowych cewników moczowych, zauważono spadek formacji biofilmu dla *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus mirabilia* i *Salmonella enterica* (Mireles i in. 2001). Formowanie biofilmu jest jednym z bakteryjnych strategii przetrwania. Wprowadza ono równowagę w środowisku bakteryjnym i pozwala na tworzenie agregatów i klasterów, które umożliwiają bakteriom odpowiedź na dynamicznie zmieniające się środowisko. Komórka bakteryjna uczy się adaptować do życia jako twór wielokomórkowy, ze względu na unieruchomienie jej w biofilmie. Niemal 80% bakterii tworzących biofilmy jest odpowiedzialne za nawracające infekcje. Biofilm sam w sobie składa się głównie z EPSów (polisacharydów zewnątrzkomórkowych), DNA i białek. Obecność polisacharydów zapewnia dobrą adhezję powierzchniową, stabilność komórkową i odpowiednie miejsce do przyłączania się enzymów, komórek i antybiotyków.

Biofilm jako „kolonia” sprawia, że komórki mają dobre warunki do wzrostu. Jednakże ich przeżywalność i użyteczność dla „większego dobra” mocno zależy od ich wskaźnika przeżycia – tym samym, czy są w stanie szybko i odpowiednio ulegać mutacjom oraz czy są zdolne do wymiany informacji zawartej w ich genach. Jest możliwe, że jednym z głównych powodów, dlaczego biofilmy bakteryjne są tak odporne na antybiotyki jest kwestia ich wysokiego tempa mutacji. Drugim bardzo możliwym powodem jest ubytek tlenu i składników odżywczych, szczególnie w przypadku niskich warstw biofilmu. Niska aktywność metaboliczna oznacza niską odpowiedź na antybiotyki. W tym samym czasie, zmiany pH w warstwach biofilmu mogą powodować kumulację kwasów organicznych. Ten fakt pozwala bakterii w biofilmie deaktywować związki, które mogą zagrażać jedności biofilmu. Biofilmy zawierające wiele gatunków bakterii mają tendencję do bycia nawet bardziej odpornymi na antybiotyki. Stan metaboliczny komórek jest ważny przy odnawianiu uszkodzonej kolonii (Algburi i in. 2016).

3. Podsumowanie

Powstawanie biofilmów bakteryjnych jest poważnym i nawracającym problemem nie tylko dla medycyny, ale również dla przemysłu spożywczego, przemysłu pasz oraz produkcji farmaceutyków. Większość dostępnych obecnie badań i eksperymentów dotyczy specyficznych właściwości biofilmu i jego aspektów biologicznych. Istnieje wiele badań dotyczących jego bioinżynierii, otrzymaniu specyficznej ekspresji genów czy wytwarzaniu konkretnych substancji. Badacze skupiają się głównie na biologii bakterii i jej zastosowaniach biotechnologicznych. Badania dotyczące adhezji bakteryjnej i formowaniu się biofilmu skupiają się głównie na właściwościach biofilmu samych w sobie, czynników, które mogą wpływać na adhezję bakterii, mechanizmów adhezji i modyfikacji, które mogłyby być pomocne w dogłębnym zrozumieniu bakterii jako prokariota. Istnieje kilka badań dotyczących użycia specjalistycznych technik i metod, np. prądów elektrycznych czy laserów CO₂ czy też produkcji nowych materiałów na implanty, które są mniej atrakcyjnymi powierzchniami dla adhezji. Można znaleźć badania dotyczące długoterminowego efektu warstw biofilmu. Nie ma jednak wystarczającej ilości badań dotyczących aspektów fizykochemicznych i tego, dlaczego ta sama bakteria, która jest odpowiedzialna za formowanie biofilmu, może być odpowiedzią na usunięcie go z powierzchni. Dogłębne zbadanie takich właściwości może pomóc w obniżeniu ilości szpitalnych infekcji. Formowanie biofilmu jest bardzo

poważnym praktycznym i teoretycznym problemem, nie tylko ze względu na zagrożenie zdrowia pacjenta, ale również w związku z komplikacjami po przeszczepie i odporności na antybiotyki. W obecnie dostępnej literaturze, badacze głównie skupiają się na metodach otrzymywania biosurfaktantów, ich CMC, liczbie agregacyjnej, właściwościach biologicznych i zastosowaniach (Krzyczkowska i Białecka-Florjańczyk 2012, Pacwa-Płociniczak 2011). Trudno natomiast znaleźć informacje na temat właściwości zwilżających biosurfaktantów, ich połączeniu ze zwilżalnością implantów, adsorpcją czy też zestawieniu tych właściwości z tworzeniem biofilmu.

4. Literatura

- Abalos A, Pinazo A, Infante MR i in. (2001) Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. *Langmuir*, 17: 1367-71.
- Algburi A, Comito N, Kashtanov D i in. (2016) Control of Biofilm Formation: Antibiotics and Beyond, *Applied and Environmental Microbiology* 83 (3).
- Barton AJ, Sagers RD, Pitt WG (1996) Measurement of bacterial growth rates on polymers, *Journal of Biomedical Materials Research* 32: 271-278.
- Chrzanowski Ł, Ławniczak Ł, Czaczyk K (2012) Why do microorganisms produce rhamnolipids? *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 28(2): 401-419.
- Gottenbos B, Grijpma D, Van der Mei HC i in. (2001) Antimicrobial effects of positively charged surfaces on adhering Gram-positive and Gram-negative bacteria, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48: 7-13.
- Gottenbos B, Van der Mei HC, Busscher HJ (2000) Adhesion and surface growth of *Staphylococcus epidermis* and *Pseudomonas aeruginosa* on biomedical polymers, *Journal of Biomedical Materials Research* 50: 208-214.
- Harkes G, Dankert J, Feijen J (1992), Growth of uropathogenic *Escherichia coli* strains at solid surfaces. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition* 3: 403-418.
- Isoda H, Kitamoto D, Shinmoto H i in. (1997) Microbial extracellular glycolipid induction of differentiation and inhibition of the protein kinase C activity of human promyelocytic leukemia cell line HL60, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 61: 609-614.
- Kamaljeet K, Pattanathu R (2014), Rhamnolipid biosurfactants – past, present, and future scenario of global market, *Frontiers in Microbiology* 5: 454.
- Kim AK, Jung SYB, Lee DKA i in. (1998) Suppression of Inflammatory Responses by Surfactin, a Selective Inhibitor of Platelet Cytosolic Phospholipase A₂ 55 (7): 975-985.
- Klockgether J, Tümmler B (2017), Recent advantages in understanding *Pseudomonas aeruginosa* as a pathogen. *F1000Research* 6: 1261.
- Kozajda A, Szadkowska-Stańczyk I (2012) Bakterie *Bacillus subtilis* jako problem legislacyjny higieny pracy w Polsce, *Medycyna Pracy*, 63 (1): 91-96.
- Krzyczkowska J, Białecka-Florjańczyk E (2012) Biotechnologiczna synteza związków powierzchniowo czynnych i przykłady ich praktycznego zastosowania, *ŻYWNOŚĆ. Nauka. Technologia. Jakość*, 4 (83): 5-23.
- Meena KR, Kanwar SS (2015) Lipopeptides as the Antifungal and Antibacterial Agents: Applications in Food Safety and Therapeutics, *BioMed Research International* 473050.
- Mireles JR, Toguchi A, Harshey RM (2001) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. *Journal of Bacteriology* 183: 5848-5854.
- Pacwa-Płociniczak M, Płaza GA, Piotrowska-Seget Z i in. (2011) Environmental applications of biosurfactants: recent advances., *International Journal of Molecular Sciences* 12: 633-654.
- Rodrigues L, Banat IM, Teixeira J i in. (2006). Biosurfactants: potential applications in medicine, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57: 609-618.
- Rodrigues L, Banat IM, Teixeira J i in. (2006). Biosurfactants: potential applications in medicine, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 57: 609-618.

14. Biosurfaktanty w medycynie

Biosurfactants and surfactants in medicine

Rekiel Edyta

Katedra Zjawisk Międzyfazowych, Instytut Nauk Chemicznych, Wydział Chemii,
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin
Opiekun naukowy: prof. dr hab. Anna Zdziennicka

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

Słowa kluczowe: biosurfaktanty, surfaktanty, medycyna, farmacja

Streszczenie

Surfaktanty są substancjami, które człowiek spotyka w swoim życiu codziennym. Są one obecnie wykorzystywane głównie w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym, cukierniczym, kosmetycznym czy przemyśle pasz. Ponadto surfaktanty są składnikami leków, szczepionek i detergentów. Te szerokie zastosowania zawdzięczają one swojej amfifilowej budowie: w każdej cząsteczce surfaktantu można wyróżnić część hydrofilową i hydrofobową. Taka forma pozwala na interakcję substancji aktywnych powierzchniowo z cząsteczkami o różnej polarności. Niestety, wysokie zużycie surfaktantów jest niekorzystne dla środowiska, szczególnie dla wód gruntowych. Coraz częściej jednak, wielu przedsiębiorców sięga po rozwiązania proekologiczne, a tym samym, wykorzystuje substancje pochodzenia naturalnego, które posiadają zbliżone, o ile nie lepsze, właściwości od syntetycznych surfaktantów. Takimi substancjami są biosurfaktanty – substancje powierzchniowo czynne produkowane przez mikroorganizmy: bakterie, grzyby bądź drożdże. Są one nietoksyczne oraz można je produkować z pozostałości po ropie naftowej czy też innych materiałów odpadowych. Biosurfaktanty są biodegradowalne, a także dodatkowo posiadają specyficzne właściwości przeciwbakteryjne, przeciwgrzybiczne, a nawet przeciwwirusowe, a niektóre traktowane są nawet jako antybiotyki.

1. Wstęp

W ciągu ostatniej dekady, zużycie komercyjne różnych biosurfaktantów, szczególnie na polu medycyny znacząco wzrosło. Ich przeciwgrzybicze, antibakteryjne oraz przeciwwirusowe właściwości sprawiają, że stają się one ważnymi cząsteczkami w walce z wieloma chorobami i są doskonałymi substancjami terapeutycznymi. Dodatkowo, ich właściwości antyadhezyjne w przypadku wielu bakterii można wykorzystać w pokryciach narzędzi chirurgicznych, czy też powierzchni implantów, co może znacząco wpłynąć na zmniejszenie liczby infekcji szpitalnych bez wykorzystywania wyspecjalizowanych, a przede wszystkim syntetycznych substancji. (Rodrigues i in. 2006). Biosurfaktanty stanowią ogromną liczbę związków, a tym samym, struktur chemicznych: glikolipidów, lipopetydów, kompleksów polisacharydowych i białkowych, a także fosfolipidów, kwasów tłuszczowych i lipidów obojętnych. Stanowią składniki kosmetyków, dezodorantów, płynów do soczewek, odżywek do włosów czy past do zębów, wykorzystuje się je w przemyśle papierniczym, petrochemii i włókiennictwie. Biosurfaktanty Są obecne jako konserwanty, antybiotyki, leki poprawiające działanie płuc, środki lecznicze w terapiach guza mózgu czy białaczki (Krzyczkowska i Białecka-Florjańczyk 2012)

Cooper i Goldenberg (Cooper i Goldenberg 1987) opisali różne bioemulgatory produkowane przez dwa szczepy gatunku *Bacillus*, które charakteryzowały się wyraźnymi różnicami we właściwościach powierzchniowych i emulgujących. Tym samym, właściwości i funkcje fizjologiczne będą zależały od danej klasy biosurfaktantów. Dodatkowo, biosurfaktanty można dopasowywać do różnorodnych zastosowań, a także modyfikować je przez zmianę warunków wzrostu czy ograniczanie substancji pokarmowych mikroorganizmom je produkującym (Fiechter 1992).

2. Opis zagadnienia

Większość biosurfaktantów to metabolity wtórne, choć niektóre z nich odgrywają znaczącą rolę w zwiększaniu przeżywalności mikroorganizmów, które je wytwarzają, na przykład przez

przyspieszanie transportu składników odżywczych czy też przez działanie biobójcze. Biosurfaktanty odgrywają ważne role w zwiększaniu powierzchni wchłaniania i biodostępności substancji hydrofobowych, czyli nierozpuszczalnych w wodzie, wiązaniu metali ciężkich, patogenezie bakteryjnej, a także tworzeniu biofilmów (Singh i Cameotra 2004).

Lipopetydy są interesującym rodzajem biosurfaktantów ze względu na ich wysoką aktywność powierzchniową i właściwości antybiotyczne. Mogą działać jako leki przeciwwirusowe, środki przeciwnowotworowe, inhibitory określonych toksyn i enzymów. Ahimou i współpracownicy (Ahimou i in. 2000) stwierdzili, że hydrofobowość bakterii, a ich profil lipopetydowy różni się w zależności od badanego szczepu. Ituryna A jest produkowana przez wszystkie szczepy *Bacillus subtilis*, ale to surfaktyna jest najbardziej efektywna w modyfikowaniu hydrofobowego charakteru powierzchni *Bacillus subtilis*. Jest to o tyle ważne, że w połączeniu z właściwościami antygrzybicznymi, można kontrolować biologicznie choroby roślin. Ituryna A jest silnym przeciwgrzybicznym lipopetydem. Mechanizm działania ituryny A jest związany z zakłócaniem integralności błony cytoplazmatycznej i tworzeniem małych pęcherzyków powodujących agregację cząsteczek śródbłonna w komórkach drożdży. Co więcej, zwiększa to również przewodność samej biomolekularnej błony lipidowej (Thimon i in. 1995). Pierwszy lipopeptyd, Polimyksyna A, odkryty i wyizolowany w 1949 z bakterii glebowej *Bacillus polymyxa*. CubicinR (Daptomycyna) był pierwszym cyklicznym antybiotykiem lipopetydowym, który został zatwierdzony przez FDA w leczeniu poważnych zakażeń krwi i infekcji skóry wywołanych przez niektóre bakterie Gram-dodatnie (Meena i in. 2017).

Surfaktyna została powiązana z kilkoma działaniami biologicznymi takimi jak: hamowanie tworzenia skrzepu fibrynowego, wywołanie powstawania kanałów jonowych w dwuwarstwowych błonach lipidowych, hamowanie cyklicznego monofosforanu adenozy, a także hamowanie płytek krwi i cytozolowej fosfolipazy A2 (PLA2). Do tego wykazuje także działanie przeciwnowotworowe i przeciwwirusowe (Rodrigues i in. 2006). Kim i współpracownicy (Kim i in. 1998) wykazali, że surfaktyna jest selektywnym inhibitorem cytozolowej PLA2 jak również jest środkiem przeciwzapalnym w związku z bezpośrednią interakcją z wymienioną fosfolipazą. Surfaktyna C zwiększa aktywację prourokinazy (aktywatora plazminogenu) i zwiększa zmianę konformacyjną plazminogenu, co prowadzi do zwiększonej fibrynolizy in vitro i in vivo (Kikuchi i in. 2002). Układ plazminogen-plazmina jest związany z rozpuszczaniem skrzepów krwi, a także wieloma fizjologicznymi i patogennymi procesami wymagającymi zlokalizowanej proteolizy.

Mykoplazma to najmniejszy wolnożyjący organizm i pasożyt komórek eukariotycznych. Jest jednym z głównych zanieczyszczeń pojawiających się w hodowlach tkanek ssaków. Mykoplazmy są poważnymi czynnikami chorób ludzi i zwierząt, takich jak ostre zapalenia dróg oddechowych (w tym zapalenie płuc), choroby układu moczowo-płciowego oraz patogenezą AIDS. Leczenie antybiotykami to najskuteczniejsza procedura wyeliminowania lub tłumienia mykoplazmy. Ze względu na swoje właściwości powierzchniowe i wpływ na błonę komórkową, surfaktyna jest stosowana komercyjnie do utwardzania kultur komórkowych i oczyszczania produktów pochodzenia biotechnologicznego od skażenia mykoplazmą. Ma ona wszechstronne właściwości bioaktywne ze znacznym działaniem przeciwzapalnym wobec aktywności mykoplazmy. Rozpad tych drobnoustrojów związany jest z fizykochemiczną interakcją surfaktyny z zewnętrzną częścią dwuwarstwowej błony lipidowej, co powoduje zmiany w przepuszczalności i przy wyższych stężeniach surfaktyna zaczyna zachowywać się jak detergent i doprowadza do rozpadu układu błony mykoplazmowej (Meena i in. 2017).

Glikolipidy to najczęstsza klasa biosurfaktantów, a także jedna z najbardziej skutecznych, jeśli chodzi o właściwości powierzchniowo czynne. Takimi substancjami są, na przykład, lipidy trehalozy pozyskiwane z *Mycobacterium* i pokrewnych mu szczepów, a także rhamnolipidy pozyskiwane z gatunków *Pseudomonas* oraz soforolipidy produkowane przez drożdże. Właściwości antibakteryjne, immunologiczne i neurologiczne przypisano manno- syletrytolowi (MEL), drożdżowemu glikolipidowemu biosurfaktantowi produkowanemu z olejów roślinnych przez szczepy *Candida*. Kitamoto i współpracownicy (Kitamoto i in. 1993) wykazali, że MEL posiada właściwości przeciwbakteryjne, szczególnie przeciwko bakteriom Gram dodatnim. Dodatkowo, niektóre

glikolipidy mają zdolność do zwiększania różnicowania komórek zamiast ich proliferacji, szczególnie w przypadku ludzkiej białaczki promielocytowej (Isoda i in. 1997).

Soforolipidy to glikolipidy wytwarzane przez pewną liczbę gatunków drożdży, w tym *Candida bombicola* oraz *Candida apicola*, jeśli wzrost następuje na mieszaninie węglowodanów i kwasów tłuszczowych. Wykazano, że soforolipidy są skutecznymi środkami plewnikobójczymi, lekami przeciwdziałającymi rozwojowi HIV oraz skutecznymi środkami przeciwnowotworowymi. Co więcej, biosurfaktanty te mogą mieć działanie immunomodulujące (Sleiman i in. 2009). Soforolipidy oferują biodegradowalność, niską toksyczność oraz a ich produkcja opiera się na zasobach odnawialnych. Amerykańska FDA zatwierdziła biosurfaktanty/estry cukrowe jako odpowiednie do stosowania w żywności i produktach farmaceutycznych. Soforolipidy nie podrażniają skóry, nie wywołują reakcji alergicznych i mogą być bezpiecznie stosowane w okolicach jamy ustnej. Cytotoksyczność wyznaczona na ludzkich keratynocytach naskórka uznana została za niską (van Bogaert i in. 2011). Lipid-A mannosylerytrytolu zawierają liposomy kationowe, polepsza transfekcję genów między komórkami ssaków od pięciu do siedmiu razy. Liposomy są obiecującymi kandydatami do szerokiej gamy zastosowań leczniczych. Po dalszej modyfikacji, soforolipidy mogą zostać przekształcone w liposomy, co sprawia, że mogłyby być używane w układach dostarczania środków terapeutycznych. Joshi-Navare i Prabhune (Joshi Navare i Prabhune 2013) ustalili, że soforolipidy mogą zwiększać rozpuszczalność antybiotyków lub zapewnić im ochronę przed niekorzystnym wpływem środowiska i tym samym zwiększyć efektywność działania samego antybiotyku. Soforolipidy mają charakter przeciwdrobnoustrojowy, a gdy są stosowane jednocześnie ze środkami antybiotycznymi, zmniejszają prawdopodobieństwo przeżywalności bakterii i wspomagają odporność. Ze względu na łatwiejszą możliwość działania cząsteczek antybiotyku, hamowanie to może zostać osiągnięte nawet przy niskich stężeniach substancji aktywnych.

Jak wspomniano wcześniej, produkowane przez *Candida antarctica* MEL, rhamnolipidy produkowane przez *Pseudomonas aeruginosa* czy surfaktyna produkowane przez *Bacillus subtilis* i *Bacillus licheniformis* wykazują działanie przeciwdrobnoustrojowe. Grangemard i współpracownicy (Grangemard i in. 2001) opisali właściwości chelatujące lichenyzyzny, które mogą być odpowiedzią na destrukcyjne działanie lipopeptydów wobec błony komórkowej. Carrillo i współpracownicy (Carrillo i in. 2003) opisali mechanizm zwiększający przepuszczalność błony przez surfaktynę, który tłumaczy powstawanie porów i podstawę antybiotykowego i hemolitycznego działania tych lipopeptydów. Tym samym, właściwości barierowe błony komórkowej mogą zostać uszkodzone w miejscach, w których surfaktyna wchodzi w interakcję z fosfolipidami w stężeniu większym niż to potrzebne do solubilizacji. Taka właściwość powoduje zaburzenia strukturalne, które mogą być podstawowym sposobem antybiotycznego działania takiego lipopeptydu. Peptydy tego typu, które działają na integralność błony, ale nie na ważne życiowe procesy komórkowe mogą stać się nową generacją antybiotyków. Co więcej, surfaktyna ma działanie przeciw-nowotworowe, aktywność przeciwgrzybiczną oraz zastosowania farmakologiczne takie jak hamowanie tworzenia skrzepu fibrynowego, hemoliza czy też tworzenie błonowych kanałów jonowych (Rodrigues i in. 2006). Surfaktyna i jej analogi są uznawane za środki przeciwwirusowe: znaczący efekt hamujący uzyskano dla pumilacydiny w HSV-1, a także efekt hamujący H⁺, K⁺-adenozynotrifosfatazy, a także działanie przeciwrzodowe (Naruse i in. 1990). Stwierdzono również działanie przeciwko wirusowi ludzkiego niedoboru odporności (HIV-1) (Itokawa i in. 1994). Przeciwwirusowe działanie surfaktyny miało być spowodowane interakcjami fizykochemicznymi pomiędzy aktywnym błonowo surfaktantem a błoną lipidową wirusa. Ituryna produkowana przez *Bacillus subtilis* wpływa na morfologię i strukturę komórek drożdży. Biosurfaktant ten ma zdolność przechodzenia przez ścianę komórkową przez formowanie małych pęcherzyków i gromadzenie cząsteczek śród błonka. Ituryna przechodzi również przez błonę komórkową, wchodzi w interakcję z błoną jądra i również z błonami innych organelli cytoplazmatycznych (Thimon i in. 1995).

Biosurfaktanty mogą zostać zastosowane jako środki emulgujące do transportu leków do miejsca infekcji, jako środki uzupełniające płucny lipoproteinowy środek powierzchniowo-czynny i jako adiuwanty dla szczepionek (Rodrigues i in. 2006). Wykazano, że bakteryjne lipopeptydy stanowią silne nietoksyczne i niepirogenne adiuwanty immunologiczne przy zmieszaniu z konwencjonalnymi antygenami (Isoda i in. 1997).

Chociaż zdecydowanie rośnie potencjał zastosowań biosurfaktantów, szczególnie w medycynie, niektóre z tych substancji mogą stanowić ryzyko. *Pseudomonas aeruginosa* odpowiedzialny za produkcję rhamnolipidu jest bakterią odpowiedzialną za wiele szpitalnych infekcji, szczególnie u osób z obniżoną odpornością, a także może powodować przewlekłe zakażenia u pacjentów z mukowiscydozą. Zwiększona kontrola sygnalizacji między komórkami może pomóc w odpowiedniej ekspresji genów i koordynacji wytwarzanych czynników wirulencji. Przemysł kosmetyczny i zdrowotny wykorzystują ogromne ilości surfaktantów do produkcji różnorodnych materiałów, między innymi, do produkcji środków owadobójczych, preparatów do leczenia trądziku, płynów do soczewek, farb do włosów, dezodorantów, odżywek do paznokci, szminek, cieni do powiek, tuszy do rzęs, nici dentystycznych, past do zębów, kondomów, produktów dla dzieci, środków pielęgnacyjnych do stóp, środków antyseptycznych i produktów do golenia i depilacji. Biosurfaktanty znane są ze swoich lepszych właściwości w porównaniu do surfaktantów syntetycznych i niskiej alergenicności. Substancje te są bardzo kompatybilne z produktami dotyczącymi skóry. Szczególnie rhamnolipidy wykorzystuje się jako dodatki kosmetyczne, przede wszystkim w emulsjach i liposomach (Rodrigues i in. 2006).

Nowoczesne środki powierzchniowo czynne muszą spełniać wymagania rynku dotyczące łagodności w działaniu i odpowiedniej „naturalności”. Syntetyczne surfaktanty są tanie, łatwo dostępne i mają szerokie zastosowania; biosurfaktanty niosą korzyści ekologiczne, zwiększają świadomość konsumentką i wykazują niską toksyczność. Obie te grupy związków wykorzystuje się w produkcji leków. Surfaktanty zwiększają wchłanianie przezskórne, a także polepszają rozpuszczalność leków i środków farmaceutycznych. Do tego, zwiększają hydrofilowość baz olejowych stosowanych w maściach i plastrach. Środki powierzchniowo czynne stosuje się w farmaceutycznych preparatach białek do konkurowania o powierzchnie, które mogą powodować rozkład i agregację substancji aktywnych, i najczęściej stosuje się tu niejonowe surfaktanty. Z biosurfaktantów najczęściej wykorzystuje się pochodne węglowodanów: sorbitolu, sacharozy, glukozy, a także pochodne olejów roślinnych otrzymywanych z orzechu kokosa czy ziarna palmowego. Wyściółka fosfolipidowa płuc ułatwia przenikanie tlenu przez tkankę i przechodzenie do krwi. Substancje powierzchniowe zawierające białka zapewniają skuteczność w leczeniu zaburzeń oddechowych, a także są obiecujące w leczeniu chorób płuc u niemowlaków. Biosurfaktanty oferują działania terapeutyczne, a także antyadhezyjne (Sekhon 2013).

3. Podsumowanie

Wiele cech biosurfaktantów stanowi o ich potencjalnych zastosowaniu w medycynie. Są to związki przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe i przeciugrybiczne, a co więcej, mogą być użyteczne w produkcji leków immunomodulujących i produkcji środków adhezyjnych, szczepionek i w terapii genowej. Biosurfaktanty stosowane są w transfekcji genów, jako ligandy do wiązania immunoglobulin, jako adiuwanty dla antygenów, a także jako inhibitory tworzenia i aktywatory lizy skrzepu fibrynowego. Biosurfaktanty są badane pod kątem tworzenia antyadhezyjnych powłok dla narzędzi chirurgicznych oraz implantów, tym samym zmniejszając występowanie zakażeń szpitalnych oraz zużycie syntetycznych leków i substancji chemicznych. Mogą być wykorzystywane do produkcji probiotyków, preparatów zwalczających choroby dróg moczowo-płciowych i immunoterapii płucnej.

Mimo to, wykorzystanie biosurfaktantów jest nadal mocno ograniczone, głównie przez ich wysokie koszty produkcji, koszty ekstrakcji oraz brak informacji na temat ich toksyczności w przypadku człowieka. Dalsze badania nad komórkami człowieka i ich naturalną mikroflorą potrzebne są do skutecznego wykorzystywania biosurfaktantów w obszarach biomedycznych i związanych ze zdrowiem (Rodrigues i in. 2006).

4. Literatura

Krzyczkowska J, Białecka-Florjańczyk E (2012) Biotechnologiczna synteza związków powierzchniowo czynnych i przykłady ich praktycznego zastosowania, *ŻYWNOŚĆ. Nauka. Technologia. Jakość*, 4 (83): 5-23.

- Rodrigues L, Banat IM, Teixeira J i in. (2006) Biosurfactants: potential applications in medicine, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 57: 609-618
- Cooper D, Goldenberg B (1987) Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 224–229.
- Fiechter A (1992) Biosurfactants: moving towards industrial application, *Trends in Biotechnology* 10: 208–218.
- Singh P, Cameotra S (2004) Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends Biotechnology* 22: 142–146.
- Ahimou F, Jacques P, Deleu M (2000) Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. *Enzyme and Microbial Technology* 27: 749–754.
- Thimon L, Peypoux F, Wallach J i in. (1995) Effect of lipopeptide antibiotic, iturin A, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cells. *FEMS Microbiology Letters* 128: 101–106.
- Kim AK, Jung SYB, Lee DKA i in. (1998) Suppression of Inflammatory Responses by Surfactin, a Selective Inhibitor of Platelet Cytosolic Phospholipase A2 55 (7): 975-985.
- Kikuchi T, Hasumi K (2002) Enhancement of plasminogen activation by surfactin C: augmentation of fibrinolysis in vitro and in vivo. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1596: 234–245.
- Kitamoto D, Yanagishita H, Shinbo T i in. (1993) Surface active properties and antimicrobial activities of mannosylerythritol lipids as biosurfactants produced by *Candida antarctica*. *Journal of Biotechnology* 29: 91–96.
- Isoda H, Kitamoto D, Shinmoto H i in. (1997) Microbial extracellular glycolipid induction of differentiation and inhibition of protein kinase C activity of human promyelocytic leukaemia cell line HL60. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 61: 609–614
- Grangemard I, Wallach J, Maget-Dana R i in (2001). Lichenysin: a more efficient cation chelator than surfactin. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 90: 199–210.
- Carrillo C, Teruel J, Aranda F i in. (2003) Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1611: 91–97.
- Naruse N, Tenmyo O, Kobaru S i in. (1990) Pumilacidin, a complex of new antiviral antibiotics: production, isolation, chemical properties, structure and biological activity, *Journal of Antibiotics (Tokyo)* 43: 267–80.
- Itokawa H, Miyashita T, Morita H i in. (1994) Structural and conformational studies of [Ile7] and [Leu7] surfactins from *Bacillus subtilis*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)* 42: 604–607.
- Sekhon B (2013) Surfactants: Pharmaceutical and Medicinal Aspects, *Journal of Pharmaceutical Technology, Research and Management* 1: 11-36.
- Sleiman JN, Kohlhoff SA, Roblin PM i in. (2009) Sophorolipids as Antibacterial Agents, *Annals of Clinical & Laboratory Science* 39 (1) 60-63.
- Van Bogaert INA, Zhang J, Soetaert W (2011) Microbial synthesis of sophorolipids, *Process Biochemistry* 46 (4): 821-833.
- Joshi-Navare K, Prabhune A (2013) A Biosurfactant-Sophorolipid Acts in Synergy with Antibiotics to Enhance Their Efficiency, *Hindawi Publishing Corporation* 2013: 8 pages.
- Meena KR, Sharma A, Kanwar SS (2017) Microbial Lipopeptides and their Medical Applications, *Annals of Pharmacology and Pharmaceutics* 2 (11): 1111.

15. Triterpeny pentacykliczne o działaniu przeciwbakteryjnym.

Część I - kwas azjatykowy.

Antibacterial effect of pentacyclic triterpenes. Part I - asiatic acid.

Zuzanna Sycz ⁽¹⁾, Monika Sępek ⁽²⁾

⁽¹⁾ Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, ul. J. Mikulicza-Radeckiego 9, 50-345 Wrocław

⁽²⁾ Klinika Chirurgii Ogólnej, Małoinwazyjnej i Endokrynologicznej, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, ul. Borowska 213, 50-556 Wrocław
Opiekun naukowy: dr hab. Dorota Wojnicz

Zuzanna Sycz: sycz.zuzanna@gmail.com

Słowa kluczowe: *Centella asiatica*, *Escherichia coli* (UPEC), zakażenia układu moczowego (ZUM), biofilm

Streszczenie

Wobec stale rosnącego zapotrzebowania na nowe i skuteczne antybiotyki, prowadzone są poszukiwania związków pochodzenia roślinnego o przeciwbakteryjnym mechanizmie działania. Niniejszy artykuł przeglądowy ma na celu przedstawienie dostępnych danych naukowych i wyników badań potwierdzających aktywność antybakteryjną jednego z przedstawicieli triterpenów pentacyklicznych tj. kwasu azjatykowego.

1. Wstęp

W ostatnich latach nastąpił wzrost zainteresowania naturalnymi źródłami pochodzenia substancji leczniczych. W dobie wzrostu oporności bakterii na antybiotyki intensywnie poszukuje się efektywnie działających, a jednocześnie bezpiecznych dla organizmu człowieka związków roślinnych, które mogłyby stać się skutecznym narzędziem zarówno w zapobieganiu jak i leczeniu chorób o etiologii bakteryjnej. Uważa się, że produkty roślinne stosowane w ramach fitoterapii mogą wspomagać standardową farmakoterapię. Szczególne zainteresowanie wiąże się z możliwością ich wykorzystania w zwalczaniu przewlekłych i/lub nawracających stanów zapalnych spowodowanych tworzeniem biofilmów bakteryjnych.

Biofilm bakteryjny stanowi często przyczynę niepowodzeń w leczeniu przewlekłych i/lub nawracających zakażeń układu moczowego (ZUM), także u pacjentów zacewnikowanych. Dominujący udział w etiologii tych zakażeń mają bakterie Gram-ujemne, w szczególności uropatogenne szczepy *Escherichia coli* (UPEC). Posiadają one szereg cech wirulencji warunkujących przyleganie bakterii do komórek uroepitelialnych. Należą do nich: hydrofobowość powierzchni komórek bakteryjnych, wytwarzanie adhezyn, fimbrii typu curli oraz fimbrii typu P (zdolność do hemaglutynacji erytrocytów), a także zdolność do ruchu.

Wytwarzana przez bakterie żyjące w biofilmie macierz pozakomórkowa (*ang. extracellular polymeric substance*, EPS) utrudnia przenikanie antybiotyków do głębszych warstw biofilmu. Wchodzące w skład EPS egzopolisacharydy zwiększają liczbę wolnych grup funkcyjnych, które mogą wychwytywać i wiązać cząsteczki leku zanim dotrze on do bakterii. W ten sposób ograniczają one dyfuzję antybiotyków do wnętrza biofilmu. Obecność EPS powoduje, że drobnoustroje tworzące biofilm stają się również niedostępne dla układu immunologicznego gospodarza (Gebreyohannes et al. 2019).

Powolna penetracja antybiotyków do głębszych warstw biofilmu może spowodować ich inaktywację przez enzymy bakteryjne lub ich usuwanie z komórek za pomocą pomp efluksowych (*ang. multi-drug resistance*, MDR). Problemy z leczeniem przewlekłych i/lub nawracających infekcji spowodowanych przez bakterie żyjące w biofilmie, wynikają nie tylko z trudności penetracji leków przez ich strukturę, ale również mogą być spowodowane zmianą ekspresji genów kodujących czynniki wirulencji, genów mających istotne znaczenie w procesie tworzenia i rozwoju struktury

biofilmu oraz genów kodujących transportery leków oraz białka regulatorowe (Ramos-Vivas et al. 2019).

Komórki bakteryjne tworzące strukturę biofilmu charakteryzują się zmienionym metabolizmem w stosunku do form planktonowych. W głębszych warstwach biofilmu obecne są tzw. komórki superodporne - „uparte” (*ang. persisters*) charakteryzujące się niską aktywnością metaboliczną, co osłabia efekt działania środków przeciwdrobnoustrojowych, dzięki czemu komórki te mogą przeżyć w obecności bójczych stężeń antybiotyków i ponownie odtworzyć biofilm po zakończeniu cyklu terapeutycznego (Gollan et al. 2019).

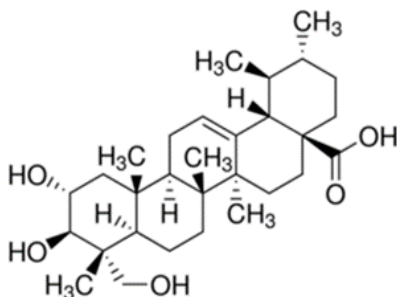
Jak wiadomo, zarówno biofilmy naturalnie występujące w organizmie człowieka jak i biofilmy utworzone przez patogenne drobnoustroje zazwyczaj nie tworzą jednogatunkowego konsorcjum, lecz składają się z wielu gatunków mikroorganizmów. Szczególnie trudnymi do zwalczania są biofilmy wielogatunkowe, ponieważ oprócz zmiany ekspresji genów występuje również horyzontalna wymiana materiału genetycznego (np. genów oporności na poszczególne antybiotyki) między bakteriami żyjącymi w biofilmie, jak również szereg innych oddziaływań międzykomórkowych, zarówno synergistycznych jak i antagonistycznych (Madsen et al. 2012).

Skład biofilmu oraz niska aktywność metaboliczna powodują, że minimalne stężenia: hamujące i bakteriobójcze (*ang. MIC – Minimal Inhibitory Concentration i MBC – Minimal Bactericidal Concentration*), czyli stężenia leków niezbędne do zahamowania wzrostu/zabicia komórek bakteryjnych w populacji biofilmu są wielokrotnie (nawet 100-1000 razy) wyższe od bójczych stężeń tych samych leków w stosunku do form planktonowych. Tak wysokie dawki antybiotyków nie mogą być stosowane w farmakoterapii zakażeń człowieka ze względu na ich toksyczność (Brady et al. 2017). Z tych powodów poszukiwane są związki pochodzenia roślinnego, które mogą stanowić strategię alternatywną wobec antybiotykoterapii, wspomagać ją oraz zapobiegać tworzeniu się biofilmu lub ułatwiać jego eradykację.

2. Opis zagadnienia

Triterpeny pentacykliczne (TP) to wielopierścieniowe związki organiczne pochodzenia roślinnego, często wykorzystywane w fitoterapii ze względu na szerokie spektrum cennych właściwości leczniczych. Rośliny bogate w TP, do których należą m. in. wąkrota azjatycka (*Centella asiatica*) i mącznica lekarska (*Arctostaphylos uva-ursi*) są stosowane profilaktycznie w postaci suplementów diety i nutraceutyków, a także jako środki wspomagające leczenie wielu chorób, zwłaszcza o podłożu zapalnym (James et al. 2009, Jäger et al. 2009).

Do grupy TP należy m.in. kwas 2 α ,23-dihydroksyursolowy, zwany kwasem azjatykowym (*ang. asiatic acid, AA*). Jest to wywodzący się z wodorku ursanu kwas monokarboksylowy, triol i triterpenoid pentacykliczny. We wzorze strukturalnym ursan jest podstawiony grupą karboksylową w pozycji 28 i grupami hydroksylowymi w pozycjach 2, 3 i 23 (stereoizomer 2 α , 3 β) (Ryc.1). Wzór sumaryczny można zapisać jako C₃₀H₄₈O₅, masa cząsteczkowa AA wynosi 488,70 g/mol.



Rys. 1. Struktura kwasu azjatykowego.

Kwas azjatykowy, podobnie jak inne TP, jest aglikonem i metabolitem wtórnym. Występuje w korze, korku, żywicy, skórcie, woskowym nalocie liści oraz w kwiatach wielu gatunków roślin, gdzie pełni funkcję ochronną przed atakiem owadów i drobnoustrojów. Z przyłączoną resztą cukrową

(tj. jako azjatykozyd) oraz w postaci aglikonu, w szczególnie wysokim stężeniu znajduje się w liściach wąkroty azjatyckiej (*C. asiatica*), znanej jako „gotu kola” i „tygrysie ziele”. Całkowita frakcja triterpenoidów z *C. asiatica* zawiera 30% AA, 40% azjatykozydu i 30% kwasu madekasowego. Roślina ta występuje w Afryce Pd., Australii, Oceanii i krajach Azji Pd.-Wsch. (zwłaszcza w Indiach i Chinach, a także w Japonii, Malezji i Indonezji). Od ponad 3000 lat wąkrota jest jednym z głównych składników leczniczych stosowanych w tradycyjnej medycynie afrykańskiej, ajurwedyjskiej i chińskiej. Była traktowana jako *panaceum* i zalecana przede wszystkim w schorzeniach neuropsychiatrycznych oraz w leczeniu ran, trądu i syfilisu. Obecnie z uwagi na fakt, że wykazuje ogólny wpływ prozdrowotny, jest spożywana profilaktycznie nie tylko w postaci preparatów nutraceutycznych, ale także jako dodatek do sałatek i napojów. Ponadto w krajach pochodzenia jest częstym składnikiem mazideł, maści, kosmetyków, a nawet past do zębów (Karłowicz-Bodalska i in. 2013).

Wiele badań potwierdziło szereg właściwości molekularnych i farmakologicznych AA: aktywność przeciwutleniającą, przeciwzapalną, przeciwwolnorodnikową, cytoochronną, regulującą proces apoptozy oraz modulującą wobec receptorów i enzymów. W różnych badaniach *in vitro* i *in vivo* stwierdzono, że AA wpływa także na czynniki wzrostu, czynniki transkrypcyjne oraz sygnalizację komórkową. Z wyżej wymienionych właściwości wynikają następujące działania terapeutyczne AA: przeciwnowotworowe, hipotensyjne, kardioprotekcyjne, przeciwważowe, przeciwwudarowe, przeciwhiperlipidemiczne, przeciwcukrzycowe, hepatoprotekcyjne, gastroprotekcyjne, nefroprotekcyjne, moczopędne, immunostymulujące, neuroprotekcyjne, nootropowe, przeciwparkinsonowe, przeciwalzheimerowe, przeciwosteoporozowe, przeciwpierwotniakowe (zwłaszcza przeciwmalaryczne), przeciwgrzybicze, przeciwwirusowe, promieniochronne (przeciwfotostarzeniowe) oraz w leczeniu ran (Lv et al. 2018, Nagoor et al. 2018).

Istnieje jednak niewiele doniesień literaturowych uwzględniających badania opisujące przeciwbakteryjne działanie AA. Przeprowadzone w ostatnich latach eksperymenty dowiodły, że kwas ten samodzielnie (Djoukeng et al. 2005; Acebey-Castellon et al. 2011; Norzaharaini et al. 2011; Wong et al. 2012; Wojnicz et al. 2013a, Wojnicz et al. 2013b; Liu et al. 2015, Ashella et al. 2016, Harnvoravongchai et al. 2018) oraz w połączeniu z antybiotykami (Garo et al. 2007, Wojnicz et al. 2015, Wojnicz et al. 2017) wykazuje istotne działanie przeciwbakteryjne.

Przeprowadzone dotychczas badania antybakteryjnych właściwości AA koncentrowały się przede wszystkim na bakteriach żyjących w zawiesinie, czyli tzw. formach planktonowych. Obejmowały one określenie wartości MIC, wpływu na przeżywalność bakterii, na morfologię komórek i błony bakteryjne oraz oddziaływania na czynniki wirulencji bakterii takie jak: hydrofobowość powierzchni komórek bakteryjnych, zdolność do ruchu, syntezę fimbrii curli i fimbrii typu P (Djoukeng et al. 2005; Acebey-Castellon et al. 2011; Norzaharaini et al. 2011; Wong et al. 2012; Wojnicz et al. 2013a, Wojnicz et al. 2013b; Liu et al. 2015, Ashella et al. 2016, Wojnicz et al. 2017, Harnvoravongchai et al. 2018). Jak dotąd, w niewielu pracach badano wpływ AA na zdolność bakterii do tworzenia biofilmów jednogatunkowych (Garo et al. 2007, Wojnicz et al. 2015, Wojnicz et al. 2017, Harnvoravongchai et al. 2018). Natomiast do tej pory nie został jeszcze wyjaśniony wpływ AA na biofilmy wielogatunkowe, ekspresję genów oraz czynniki wirulencji bakterii żyjących w tych biofilmach.

3. Przegląd literatury

3.1 Działanie przeciwbakteryjne wobec form planktonowych bakterii

Kwas azjatykowy wyizolowany z ekstraktu metanolowego z liści czapetki gwinejskiej (*Syzygium guineense*) wykazywał znaczącą aktywność przeciwbakteryjną wobec szczepów *E. coli*, *Bacillus subtilis* i *Shigella sonnei*, wartości MIC wynosiły odpowiednio: 5, 0,75, 30 µg/krażek. AA działał silniej przeciwbakteryjnie niż pozostałe TP wyizolowane z tej rośliny, prawdopodobnie dzięki obecności dodatkowej grupy hydroksylowej w pozycji 23. Do oceny aktywności antybakteryjnej i wyznaczenia MIC zastosowano metody: krążkowo-dyfuzyjną (dyskową, dyfuzji płytkowej) oraz TLC-bioautografię (chromatografii cienkowarstwowej sprzężonej z detekcją mikrobiologiczną) (Djoukeng et al. 2005).

Silniejsze działanie przeciwbakteryjne ($MIC \geq 128 \mu\text{g/ml}$) wobec dwóch szczepów bakterii Gram-dodatnich (*Staphylococcus aureus* i *Enterococcus faecalis*), a słabsze wobec dwóch szczepów bakterii Gram-ujemnych (*E. coli* i *Pseudomonas aeruginosa*) wykazywał AA pochodzący z ekstraktu metanolowego z liści symplokosu wąskolistnego (*Symplocos lancifolia*). Do oceny aktywności antybakteryjnej zastosowano metody: krążkowo-dyfuzyjną oraz TLC-bioautografię, natomiast do wyznaczenia MIC metodę mikrorozcieńczeń (Acebey-Castellon et al. 2011).

Obecny w liściach wąkroty azjatyckiej (*C. asiatica*) AA wykazywał działanie przeciwbakteryjne wobec *Helicobacter pylori*, *E. coli*, *Streptococcus pneumoniae* i *S. aureus* w stężeniach 125-1000 $\mu\text{g/ml}$, natomiast nie był aktywny wobec *P. aeruginosa*. Z kolei azjatykozoid nie wykazywał działania przeciwbakteryjnego wobec żadnego z w/w szczepów. Do oceny aktywności antybakteryjnej zastosowano metodę krążkowo-dyfuzyjną, strefa zahamowania wzrostu wynosiła w zależności od szczepu 7-12 mm (Norzaharaini et al. 2011).

Działanie przeciwbakteryjne wobec *S. aureus* i *Bacillus cereus*, potwierdzone metodą dyfuzyjną na agarze, wykazywał AA pochodzący z ekstraktu metanolowego z liści różanecznika indyjskiego (*Melastoma malabathricum*) (Wong et al. 2012).

Bardziej szczegółowymi badaniami objęto szczepy kliniczne *E. coli* wyizolowane z moczu pacjentów z odmiedniczkowym zapaleniem nerek. Uropatogenność tych izolatów została potwierdzona badaniami genetycznymi, które wykazały obecność genów kodujących adhezyny. Kwas azjatykowy wykazywał wpływ na przeżywalność form planktonowych, co dowiodło jego aktywności bójczej. Wartości MIC wynosiły od 512 $\mu\text{g/ml}$ do 1024 $\mu\text{g/ml}$. Ponadto AA wykazał istotny wpływ na cechy wirulencji pałeczek odpowiedzialne za tworzenie i rozwój biofilmu. Już w stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$ spowodował utratę zdolności hemaglutynacyjnych związanych z obecnością fimbrii typu P. Z kolei w stężeniu 40 $\mu\text{g/ml}$ zahamował syntezę fimbrii typu curli oraz istotnie zmniejszył zdolność bakterii do ruchu. AA w stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$ wykazał aktywność antyhemolityczną (Wojnicz et al. 2013b), a także zmniejszył hydrofobowy charakter powierzchni komórek bakteryjnych. Wpłynął także na adhezję *E. coli* do komórek uropitelialnych, w stężeniu 40 $\mu\text{g/ml}$ istotnie zmniejszając liczbę pałeczek przylegających do nabłonka. AA w stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$ wywołał także zmiany morfologiczne komórek bakteryjnych. W hodowlach poddanych jego działaniu zaobserwowano: komórki wydłużone tj. filamenty długie ($>15 \mu\text{m}$) i filamenty krótkie (5-15 μm), komórki pogrubione i posiadające rozdzęcia/obrzęki śródkomórkowe oraz komórki częściowo pozbawione ściany komórkowej tzw. „ghost”. (Wojnicz et al. 2013a).

Inne badania wykazały działanie przeciwbakteryjne AA przeciwko bakteriom Gram-ujemnym: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* DT104, *P. aeruginosa* oraz Gram-dodatnim: *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *B. cereus*. Wartości MIC wobec tych szczepów bakterii mieściły się w zakresie 20–40 $\mu\text{g/ml}$, natomiast wartości MBC w granicach 32–52 $\mu\text{g/ml}$. Działanie bakteriobójcze AA wykazywał już po 6 godz. inkubacji z każdym z badanych szczepów i w zakresie temperatury od 25 do 100 st. C. W stężeniu 1xMIC powodował uszkodzenia zaburzające integralność błony komórkowej u 40-56% komórek bakteryjnych, a w stężeniu 2xMIC u 71-89% komórek. Wraz ze wzrostem stężenia AA powodował spadek wewnątrzkomórkowego stężenia jonów potasu (K^+) oraz wzrost wycieku nukleotydów z komórek bakteryjnych (Liu et al. 2015).

Badania aktywności antybakteryjnej AA metodą dyfuzyjno-studzienkową na agarze wobec *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* i *S. aureus* wykazały największą strefę hamowania wzrostu w przypadku *K. pneumoniae* (13 mm przy 25 $\mu\text{g/studzienkę}$), natomiast najmniejszą w przypadku *P. aeruginosa* (6 mm dopiero przy 75 $\mu\text{g/studzienkę}$) (Ashella et al. 2016).

E. faecalis jest bakterią Gram-dodatnią związaną z poważnymi zakażeniami szpitalnymi, spośród których najbardziej rozpowszechnione są ZUM u pacjentów zacewnikowanych. Infekcje te mogą być trudne do wyleczenia z powodu częstej oporności *E. faecalis* na wiele antybiotyków, m.in. gentamycynę, nitrofurantoinę, ampicylinę i trimetoprim/sulfametoksazol. MIC kwasu azjatykowego dla 10 klinicznych szczepów *E. faecalis* wynosił 64 i 128 $\mu\text{g/ml}$. W badaniu wpływu AA na wzrost form planktonowych *E. faecalis* największą aktywność AA zauważono po 24 godz. inkubacji, kiedy to przeżycie bakterii zmniejszyło się 250-krotnie w stosunku do próby kontrolnej. Wykazano również zmiany wielkości i rozmieszczenia komórek bakteryjnych hodowanych w obecności AA, były one większe i tworzyły agregaty zamiast łańcuchy w porównaniu do bakterii z próby kontrolnej.

Prawdopodobnie kwas AA zakłóca procesy podziału komórek co może powodować zmiany fenotypowe w morfologii komórek, np. zwiększenie ich średnicy, występowanie nieregularnych agregatów. Ponadto AA znacznie zmniejszył (a w niektórych przypadkach całkowicie zahamował) zdolność szczepów *E. faecalis* o syntezy enzymów pozakomórkowych uszkadzających tkanki gospodarza (lipazy, lecytynazy, żelatynazy) i toksyn (hemolizyny). Działając w ten sposób, AA niszczy integralność błony komórkowej i powoduje jej dysfunkcję, ponieważ takie uszkodzenie może wpłynąć na transport enzymów i toksyn z bakterii na zewnątrz, do środowiska (Wojnicz et al. 2017).

Kwas azjatykowy wykazywał silne działanie przeciwbakteryjne przeciwko komórkom wegetatywnym 19 szczepów klinicznych *Clostridium difficile*, przyjmując wartość MIC w zakresie 10-20 µg/ml. AA hamował ruchliwość bakterii, a ponadto indukował uszkodzenia błony i zmiany morfologiczne komórek, powodując w ten sposób wyciek substancji wewnątrzkomórkowych (białek i kwasów nukleinowych) już po 30 min. ekspozycji. Wykazywał również wpływ na procesy sporulacji i kiełkowania spor (zarodników), powodując widoczne uszkodzenia na powierzchni zarodników po ich ekspozycji na stężenia 10 i 100 µg/ml. Jednak z uwagi na to, że tylko kilka zarodników zostało uszkodzonych, ogólna szybkość kiełkowania nie uległa zmianie. Analiza kombinacji antybiotyków nie wykazała efektu synergicznego między AA, a wankomycyną/metronidazolem, co może wynikać z różnicy w mechanizmie działania tych związków i istnienia dla nich odmiennych „punktów uchwytu” (Harnvoravongchai et al. 2018).

3.2 Działanie przeciwbakteryjne wobec biofilmów bakteryjnych

Technika obrotowego reaktora dyskowego (*ang. rotating disk reactor, RDR*) jest odpowiednim systemem modelowym do badań podatności biofilmów na antybiotyki i inne związki testowe. Biofilm jednogatunkowy *P. aeruginosa* wyhodowany w reaktorze RDR, nie wykazywał wrażliwości na 10 µg/ml ciprofloksacyny. Jest to stężenie klinicznie istotne, ponieważ równie wysoka oporność jest obserwowana w zakażeniach bakteryjnych i odpowiada 10-krotnej wartości MIC ciprofloksacyny określonej dla form planktonowych, tj. 1 µg/ml. Ciprofloksacyna jest powszechnie stosowana w praktyce klinicznej w leczeniu nawracających ZUM wywołanych przez UPEC. Na tak przygotowanym biofilmie oceniono aktywność przeciwbakteryjną AA o stężeniach 10, 50 i 100 µg/ml. Związek ten po dodaniu do reaktora w stężeniu 10 µg/ml, nie zredukował liczby bakterii w biofilmie tj. nie zmniejszył gęstości optycznej biofilmu. Z kolei AA w stężeniach 50 i 100 µg/ml zmniejszył gęstość optyczną biofilmu w niewielkim stopniu, natomiast istotnie zwiększył jego wrażliwość na późniejsze podanie kolejnego antybiotyku tj. tobramycyny w stężeniu 100 µg/ml. Połączenie AA (10 µg/ml) z tobramycyną (100 µg/ml) zmniejszyło gęstość optyczną biofilmu w podobnym stopniu co połączenie ciprofloksacyny (10 µg/ml) z tobramycyną (100 µg/ml). MIC AA dla *P. aeruginosa* został określony jako >128 µg/ml. AA wykazuje zatem aktywność antybiofilmową działając synergistycznie z ciprofloksacyną i tobramycyną, innymi słowy zmniejsza tolerancję biofilmu na te antybiotyki, czyli nasila ich działanie przeciwbakteryjne (Garó et al. 2007).

Przeprowadzono badania określające wpływ AA (także w kombinacji z ciprofloksacyną) na proces formowania i eradykacji biofilmu na polistyrenowych płytkach titracyjnych i na silikonowych cewnikach urologicznych. W badaniach tych wykorzystano uropatogenne szczepy kliniczne *E. coli*, posiadające geny kodujące produkty istotne w procesie tworzenia biofilmu. Ilość tworzonego biofilmu oszacowano na podstawie wartości gęstości optycznej (OD) odczytywanych po upływie określonych czasów inkubacji w obecności badanych związków. Antybiofilmowy efekt mieszaniny AA o stężeniu 50 µg/ml z ciprofloksacyną zaobserwowano już po 12 godz. inkubacji na płytkach titracyjnych, a po 48 godz. na cewnikach urologicznych. Najmniejszą liczbę żywych komórek w biofilmie (mierzona wartością CFU/ml) odnotowano po 72 i 96 godz. inkubacji. Obserwacja komórek w mikroskopie fluorescencyjnym po zabarwieniu DAPI wykazała zahamowanie tworzenia agregatów bakteryjnych po 96 godz. Mieszanina AA i ciprofloksacyny zredukowała liczbę bakterii w 24-godzinnym biofilmie do 12% (Wojnicz et al. 2015).

Kolejne badania wykazały redukcję słabego i umiarkowanego biofilmu *E. faecalis* podczas inkubacji z AA przez cały czas prowadzenia obserwacji (10 dni). Przeżywalność bakterii w masie biofilmu, tj. liczba komórek bakteryjnych na ml (CFU/ml) była oznaczana po każdym czasie

inkubacji i była istotnie zmniejszona w kulturach zawierających AA w porównaniu do prób kontrolnych (Wojnicz et al. 2017).

Najnowsze wyniki badań pozostają sprzeczne w stosunku do tych opublikowanych wcześniej. Wykazano, że kwas azjatykowy nawet w stężeniu 80 µg/ml w cieście z fioletem krystalicznym (CV) nie wpływał hamująco na tworzenie biofilmu przez szczepy kliniczne *C. difficile* (Harnvoravongchai et al. 2018).

4. Podsumowanie

Zasadniczym mechanizmem przeciwbakteryjnego działania AA jest aktywność antyadhezyjna, czyli osłabienie zdolności przylegania bakterii do komórek uroepitelium. Utrudnienie adhezji bakteriom pod wpływem AA zachodzi poprzez zmiany morfologiczne w komórkach oraz zmniejszenie ekspresji czynników wirulencji takich jak hydrofobowość, obecność fimbrii typu P oraz fimbrii curli. Także zmniejszając zdolność do ruchu bakterii oraz zmieniając morfologię komórek bakteryjnych, AA upośledza możliwość dalszej kolonizacji, przez co działa antybakteryjnie (Wojnicz et al. 2013a, Wojnicz et al. 2013b).

Kwas azjatykowy zaburza integralność i powoduje nieodwracalne uszkodzenia i pęknięcia błony komórkowej bakterii. Zaburza homeostazę jonów potasu (K^+), która jest regulowana przez transportery Kdp. Kationy potasu są zaangażowane w wiele aspektów fizjologii bakterii, tj. we wzrost, przeżywalność i wirulencję. AA zwiększa uwalnianie K^+ z cytoplazmy i/lub mitochondriów, a nadmierna utrata K^+ doprowadza do śmierci komórek bakteryjnych. Ponadto, traktowanie bakterii AA promuje niekorzystne i prowadzące do śmierci komórki uwalnianie z niej nukleotydów DNA i RNA, co można określić ilościowo poprzez monitorowanie absorbancji przy długości fali 260 nm. Prawdopodobnie AA jest w stanie przeniknąć do organelli wewnątrzkomórkowych zawierających DNA, takich jak mitochondria lub jądra i spowodować ich uszkodzenie. Pomimo, że AA potrafi uszkadzać błonę lipidową, może nie być w stanie przeniknąć przez barierę macierzy zewnątrzkomórkowej (EPS) tworzącą biofilm (Liu et al. 2015, Wojnicz et al. 2017, Harnvoravongchai et al. 2018).

W cytowanych powyżej wynikach badań istnieje prawidłowość, że wartości MIC kwasu azjatykowego oznaczane przeciwko bakteriom Gram-ujemnym były wyższe niż w przypadku szczepów Gram-dodatnich. Rozbieżność ta jest związana z różnicami w budowie ścian komórkowych obu rodzajów bakterii. W osłonach bakterii Gram-ujemnych, w przeciwieństwie do Gram-dodatnich, wyróżnia się zewnętrzną błonę, która może utrudniać penetrację AA do wnętrza komórki bakteryjnej. Zauważano także, że AA wpływa hamująco na zdolność bakterii do tworzenia biofilmu w większym stopniu niż inne związki z grupy TP, ponieważ ze względu na hydrofilowy charakter warunkowany obecnością aż trzech grup hydroksylowych dobrze przenika w strukturę biofilmu (Acebey-Castellon et al. 2011, Norzaharaini et al. 2011, Wojnicz et al. 2015, Wojnicz et al. 2017).

Interesującym potencjalnym szlakiem docelowym AA i jego analogów jest ścieżka CysB. Badania z mikromacierzami DNA wykazały, że AA może modulować ekspresję genu *cysB* u *E. coli*. Izogeniczny mutant *cysB* wytwarzał biofilm inaczej niż typ dziki. Białko CysB jest regulatorem transkrypcji LysR, który kontroluje ekspresję genów biorących udział w biosyntezie cysteiny. Ponadto wykazano, że CysB jest zaangażowane w kontrolę przyzwyczajania kwasowego u *E. coli* i odpowiedzi na O-acetylo-L-serynę (Garo et al. 2007).

5. Literatura

- Acebey-Castellon IL, Voutquenne-Nazabadioko L, Doan Thi Mai H, et al. (2011) Triterpenoid saponins from *Symplocos lancifolia*. J Nat Prod, 74: 163–8
- Ashella S, Fleming AT (2016) Antimicrobial Activity of Asiatic Acid against Bacteria and Fungi. IJSR Online, 5 (8): 920–1
- Brady AJ, Laverty G, Gilpin DF (2017) Antibiotic susceptibility of planktonic- and biofilm-grown staphylococci isolated from implant-associated infections: should MBEC and nature of biofilm formation replace MIC? J Med Microbiol, 66(4): 461–9

- Djoukeng JD, Abou-Mansour E, Tabacchi R, et al. (2005) Antibacterial triterpenes from *Syzygium guineense* (Myrtaceae). *J Ethnopharmacol*, 101: 283–6
- Garo E, Eldridge GR, Goering MG, et al. (2007) Asiatic acid and corosolic acid enhance the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother*, 51: 1813–7
- Gebreyohannes G, Nyerere A, Bii C (2019) Challenges of intervention, treatment, and antibiotic resistance of biofilm-forming microorganisms. *Heliyon* 5: e02192
- Gollan B, Grabe G, Michaux C (2019) Bacterial Persisters and Infection: Past, Present, and Progressing. *Ann Rev Microbiol*, 73: 359–85
- Harnvoravongchai P, Chankhamhaengdecha S, Ounjai P, et al. (2018) Antimicrobial Effect of Asiatic Acid Against *Clostridium difficile* Is Associated With Disruption of Membrane Permeability. *Front Microbiol*, 9: 2125
- James JT, Dubery IA (2009) Pentacyclic triterpenoids from the medicinal herb, *Centella asiatica* (L.) Urban. *Molecules*, 14: 3922–41
- Jäger S, Trojan H, Kopp T, et al. (2009) Pentacyclic triterpene distribution in various plants – rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. *Molecules*, 14: 2016–31
- Karłowicz-Bodalska K, Han S, Han T (2013) *Centella asiatica* (L.) Urban, syn. *Hydrocotyle asiatica* L.– wąkrota azjatycka – znana roślina lecznicza Dalekiego Wschodu. *Post Fitoter*, 4: 225–35
- Liu WH, Liu TC, Mong MC, et al. (2015) Antibacterial effects and action modes of asiatic acid. *Biomedicine*. 2015; 5: 22–29
- Lv J, Sharma A, Zhang T (2018) Pharmacological Review on Asiatic Acid and Its Derivatives: A Potential Compound. *SLAS Technology*, 23(2): 111–27
- Madsen JS, Burmølle M, Hansen LH (2012) The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 65(2): 183–95
- Nagoor Meeran MF, Goyal SN, Suchal K et al. (2018) Pharmacological Properties, Molecular Mechanisms, and Pharmaceutical Development of Asiatic Acid: A Pentacyclic Triterpenoid of Therapeutic Promise. *Front. Pharmacol*, 9: 892
- Norzaharaini MG, Wan Norshazwani WS, Hasmah A, et al. (2011) Preliminary study on antimicrobial activities of asiaticoside and asiatic acid against selected gram positive and gram negative bacteria. *Health Environ, J* 2: 23–6
- Ramos-Vivas J, Chapartegui-González I, Fernández-Martínez M (2019) Biofilm formation by multidrug resistant Enterobacteriaceae strains isolated from solid organ transplant recipients. *Nat Sci Rep*, 9: 8928
- Wojnicz D, Kicia M, Tichaczek-Goska D (2013a) Effect of asiatic and ursolic acids on morphology, hydrophobicity and adhesion of UPECs to uroepithelial cells. *Folia Microbiol*, 58: 245–52
- Wojnicz D, Tichaczek-Goska D, Kicia M (2013b) Effect of asiatic and ursolic acids on growth and virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Turk J Biol*, 37: 556–64
- Wojnicz D, Tichaczek-Goska D, Kicia M (2015) Pentacyclic triterpenes combined with ciprofloxacin help to eradicate the biofilm formed *in vitro* by *Escherichia coli*. *Indian J Med Res*, 141: 343–53
- Wojnicz D, Tichaczek-Goska D, Korzekwa K, Kicia M, Hendrich A (2017) Anti-enterococcal activities of pentacyclic triterpenes. *Adv Clin Exp Med*, 26(3): 483–90
- Wong KC, Hag Ali DM, Boey PL (2012) Chemical constituents and antibacterial activity of *Melastoma malabathricum* L. *Nat Prod Res*, 26: 609–18

16. Triterpeny pentacykliczne o działaniu przeciwbakteryjnym.

Część II - kwas ursolowy.

Antibacterial effect of pentacyclic triterpenes. Part II - ursolic acid.

Zuzanna Sycz⁽¹⁾, Monika Sępek⁽²⁾

⁽¹⁾ Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, ul. J. Mikulicza-Radeckiego 9, 50-345 Wrocław

⁽²⁾ Klinika Chirurgii Ogólnej, Małoinwazyjnej i Endokrynologicznej, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, ul. Borowska 213, 50-556 Wrocław
Opiekun naukowy: dr hab. Dorota Wojnicz

Zuzanna Sycz: sycz.zuzanna@gmail.com

Słowa kluczowe: *Arctostaphylos uva-ursi*, *Escherichia coli* (UPEC), zakażenia układu moczowego (ZUM), biofilm

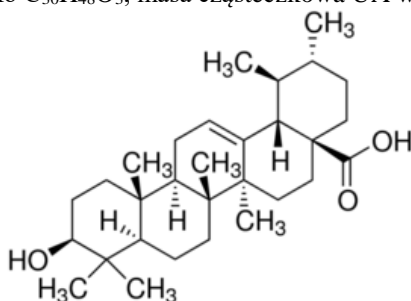
Streszczenie

Wobec stale rosnącego zapotrzebowania na nowe i skuteczne antybiotyki, prowadzone są poszukiwania związków pochodzenia roślinnego o przeciwbakteryjnym mechanizmie działania. Niniejszy artykuł przeglądowy ma na celu przedstawienie dostępnych danych naukowych i wyników badań potwierdzających aktywność antybakteryjną jednego z przedstawicieli triterpenów pentacyklicznych tj. kwasu ursolowego.

1. Wstęp

Triterpeny pentacykliczne (TP) to wielopierścieniowe związki organiczne pochodzenia roślinnego. Liście mącznicy lekarskiej (*Arctostaphylos uva-ursi*) i wąkroty azjatyckiej (*Centella asiatica*) są szczególnie bogate w TP, czemu zawdzięczają szerokie spektrum właściwości leczniczych. W fitoterapii stosowane są jako środki wspomagające leczenie chorób o podłożu zapalnym, a także profilaktycznie w postaci suplementów diety i nutraceutyków (Jäger et al. 2009).

Do grupy TP należy m.in. kwas 3 β -hydroksy-urs-12-en-28-owy, zwany kwasem ursolowym lub ursanowym (*ang. ursolic acid*, UA). Jest to wywodzący się z wodorku ursanu kwas hydroksymonokarboksyłowy i triterpenoid pentacykliczny. We wzorze strukturalnym ursan jest podstawiony grupą karboksylową w pozycji 28 i grupą 3 β -hydroksylową w pozycji 3 (Rys.1). Wzór sumaryczny można zapisać jako C₃₀H₄₈O₃, masa cząsteczkowa UA wynosi 456,70 g/mol.



Rys. 1. Struktura kwasu ursolowego

UA występuje najczęściej w postaci wolnej lub jako aglikony w przypadku saponin triterpenoidowych. W szczególnie wysokim stężeniu znajduje się w liściach mącznicy lekarskiej (*Arctostaphylos uva-ursi*), znanej jako „niedźwiedzie grono” i „chrościna”. Liść mącznicy jest surowcem farmakopealnym i zawiera ok. 0,75% UA, a ponadto szereg innych związków farmakologicznie czynnych: 6-12% arbutyny i jej metabolitów (galoilobarbutyna, metyloarbutyna, wolny hydrochinon), ok. 20% garbników, 1,2-1,5% flawonoidów (kwercetyna, izokwercetyna,

mirycetyna, kemferol, hiperozyd), uwaol, kwasy polifenolowe (6% kwasu galusowego, kwas syryngowy, p-kumarowy, elagowy i chinowy) (Jaroniewski 1986).

Mącznica lekarska występuje w strefie arktycznej i umiarkowanej półkuli północnej – w Europie, Azji i Ameryce Płn. W Polsce spotykana jest głównie w północnej części niżu, w suchych lasach sosnowych i na wrzosowiskach, w górach występuje rzadko. W 2014 r. została wpisana na listę gatunków objętych ścisłą ochroną (tzw. czerwona lista). Liście mącznicy stosowane były od wieków w europejskiej medycynie ludowej jako środek moczopędny, ściągający i odkażający, w leczeniu zakażeń układu moczowego (ZUM) oraz w łagodzeniu bólu przy kamicy nerkowej. Rdzenni Amerykanie używali liści mącznicy w leczeniu bólu głowy, w zapobieganiu i leczeniu szkorbutu oraz w zapobieganiu poronieniom (Kałwa 2016). We współczesnej fitoterapii liść mącznicy stosowany jest samodzielnie w postaci odwarów, a także jako składnik urologicznych mieszanek ziołowych. Ponadto ekstrakt z liści mącznicy wchodzi w skład farmaceutycznych preparatów złożonych – płynów i tabletek o działaniu przeciwbakteryjnym, przeciwzapalnym i moczopędnym, które są zalecane w leczeniu ZUM.

2. Opis zagadnienia

Wiele badań potwierdziło następujące właściwości molekularne i farmakologiczne UA: aktywność przeciwutleniającą, przeciwzapalną, przeciwwolnorodnikową, cytoochronną, proapoptotyczną oraz modulującą wobec receptorów i enzymów. W różnych badaniach *in vitro* i *in vivo* stwierdzono, że UA wpływa na czynniki wzrostu, czynniki transkrypcyjne oraz sygnalizację komórkową. Z wyżej wymienionych właściwości wynikają następujące działania terapeutyczne UA: przeciwnowotworowe, hipotensyjne, kardioprotekcyjne, przeciwważowe, przeciwudarowe, przeciwhiperlipidemiczne, przeciwcukrzycowe, hepatoprotekcyjne, gastroprotekcyjne, nefroprotekcyjne, moczopędne, immunostymulujące, neuroprotekcyjne, nootropowe, przeciwparkinsonowe, przeciwalzheimerowe, przeciwosteoporozowe, przeciwpięknocienne, przeciwgrzybicze, przeciwwirusowe oraz promieniochronne (przeciwfotostarzeniowe). UA może również przyspieszać proces gojenia się ran, stymulować wzrost mięśni i zmniejszać przyrost tkanki tłuszczowej. Wchodzi w skład preparatów dermatologicznych, kosmetyków oraz suplementów diety dla sportowców (Jesus et al. 2015, Navina et al. 2017, López-Hortas et al. 2018).

Istnieje jednak niewiele doniesień literaturowych opisujących przeciwbakteryjne działanie UA. Przeprowadzone w ostatnich latach eksperymenty dowiodły, że UA samodzielnie oraz w połączeniu z antybiotykami wykazuje istotne działanie przeciwbakteryjne. Przeprowadzone dotychczas badania antybakteryjnych właściwości UA koncentrowały się przede wszystkim na bakteriach żyjących w zawieszynie, czyli tzw. formach planktonowych. Obejmowały one określenie wartości MIC (*ang. Minimal Inhibitory Concentration*) i MBC (*ang. Minimal Bactericidal Concentration*), wpływu na przeżywalność bakterii, na morfologię komórek i błony bakteryjne oraz oddziaływania na czynniki wirulencji bakterii takie jak: hydrofobowość powierzchni komórek bakteryjnych, zdolność do ruchu, syntezę fimbrii curli i fimbrii typu P. Jak dotąd, w niewielu pracach badano wpływ UA na zdolność bakterii do tworzenia biofilmów jednogatunkowych. Natomiast do tej pory nie został jeszcze wyjaśniony wpływ UA na biofilmy wielogatunkowe, ekspresję genów oraz czynniki wirulencji bakterii żyjących w tych biofilmach.

3. Przegląd literatury

3.1 Działanie przeciwbakteryjne wobec form planktonowych bakterii

UA wyizolowany z liści hurmy czarnodrzew (*Diospyros melanoxylon*), w których jego zawartość wynosi aż 0,56%, oraz jego syntetyczne lipofilowe pochodne zawierające łańcuchy estrowe 3-O-kwasów tłuszczowych (C12-C18), wykazują silną aktywność przeciw bakteriom Gram-ujemnym *Pseudomonas syringae* i umiarkowaną przeciw Gram-dodatnim: *Bacillus sphaericus* i *Bacillus subtilis*. Wartość MIC dodekianianu UA, najbardziej aktywnej pochodnej wynosiła 20 µg/ml i stwierdzono, że jest ona 1,6 razy bardziej aktywna przeciwbakteryjnie niż referencyjna tetracyklina (Mallavadhani et al. 2004).

UA wykazywał aktywność przeciwbakteryjną w stosunku do Gram-dodatnich ziarniaków, takich jak *Staphylococcus aureus* oporny na metycylinę (MRSA), *Streptococcus pneumoniae* oporny na penicylinę (PRSP) i enterokoki odporne na wankomycynę (VRE): *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium*. Wartości MIC wynosiły odpowiednio: 8, 8 i 4 µg/ml. W stężeniu 2xMIC, UA działał bakteriobójczo przeciw VRE co najmniej przez 48 godz. UA wykazał silniejszą aktywność bakteriobójczą wobec *E. faecium* niż ampicylina. Wobec *E. faecalis* działał bakteriostatycznie. UA nie był natomiast aktywny wobec bakterii Gram-ujemnych: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* oraz wobec mutantów *E. coli* i *P. aeruginosa*, nadwrażliwych na leki z powodu braku pomp efluksowych (ang. *multi-drug resistance*, MDR). Wobec tych szczepów wartości MIC wynosiły > 128 µg/ml (Horiuchi et al. 2007, Chung et al. 2011).

Silniejsze działanie przeciwbakteryjne wobec dwóch szczepów bakterii Gram-dodatnich (*S. aureus* i *E. faecalis*), a słabsze wobec dwóch szczepów bakterii Gram-ujemnych (*E. coli* i *P. aeruginosa*) wykazywał UA pochodzący z liści symplokosu wąskolistnego (*Symplocos lancifolia*). Wartości MIC wynosiły 16-128 µg/ml i były najniższe wobec *E. faecalis* (Acebey-Castellon et al. 2011).

UA wyizolowany z liści rośliny znanej jako „natal plum” (*Carissa macrocarpa*) wykazywał umiarkowane działanie przeciwbakteryjne wobec trzech szczepów bakterii Gram-ujemnych: *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli* oraz trzech Gram-dodatnich: *Staphylococcus saprophyticus*, *S. aureus* i *E. faecium*. Wartości MIC wynosiły 250-500 µg/ml. Pod wpływem ekspozycji na stężenia UA niższe od MIC (sub-MICs), MIC i wyższe od MIC (supra-MICs), adhezja *E. coli* i *S. aureus* do powierzchni polistyrenowych zmniejszyła się o 71% (Moodley et al. 2011).

Określono MIC i MBC dla UA wobec 19 szczepów MRSA, wartości te przyjmowały zakresy w zależności od danego szczepu *S. aureus* i wynosiły: MIC 4-8 µg/ml, MBC 4-32 µg/ml (Kim et al. 2012).

UA wykazywał znaczącą aktywność przeciwbakteryjną wobec komórek planktonowych szczepów: *P. aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus* i *Staphylococcus epidermidis*. Ponadto wobec w/w szczepów (z wyjątkiem *P. aeruginosa*) UA działał synergistycznie z antybiotykami β-laktamowymi (ampicyliną i oksacyliną) zmniejszając ich wartości MIC, tzn. zwiększał podatność bakterii na antybiotyki. Wyniki te wskazują, że UA podawany w połączeniu z β-laktamami, może być przydatny w leczeniu zakażeń bakteriami Gram-dodatnimi (Kurek i in. 2012).

Bardziej szczegółowymi badaniami objęto 20 klinicznych szczepów uropatogennych *E. coli* (UPEC), wyizolowanych z moczu pacjentów z odmiedniczkowym zapaleniem nerek. Uropatogenność tych izolatów potwierdzono badaniami genetycznymi, które wykazały obecność genów kodujących adhezyny. UA zmniejszał przeżywalność form planktonowych już po 4 godz. Inkubacji. Wartości MIC wynosiły 512-1024 µg/ml. Ponadto UA wykazał istotny wpływ na cechy wirulencji pałeczek odpowiedzialne za tworzenie i rozwój biofilmu. Już w stężeniu 10 µg/ml spowodował utratę zdolności hemaglutynacyjnych związanych z obecnością fimbrii typu P. Z kolei w stężeniu 50 µg/ml zahamował syntezę fimbrii typu curli oraz istotnie zmniejszył zdolność bakterii do ruchu. UA w stężeniu 50 µg/ml wykazał aktywność antyhemolityczną (Wojnicz et al. 2013b), a także zmniejszył hydrofobowy charakter powierzchni komórek bakteryjnych. Wpłynął także na adhezję *E. coli* do komórek uroepitelialnych, w stężeniu 50 µg/ml istotnie zmniejszając liczbę pałeczek przylegających do nabłonka. UA w stężeniu 50 µg/ml wywołał także zmiany morfologiczne komórek bakteryjnych. W hodowlach poddanych jego działaniu zaobserwowano: komórki wydłużone tj. filamenty długie (>15 µm) i filamenty krótkie (5-15 µm), komórki pogrubione i posiadające rozdęcia/obrzęki środkomórkowe oraz komórki częściowo pozbawione ściany komórkowej tzw. „ghost”(Wojnicz et al. 2013a).

Za pomocą ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR) udowodniono, że mechanizm silnego przeciwbakteryjnego działania UA wobec *Streptococcus mutans* polega na znacznym hamowaniu transkrypcji większości genów odpowiadających za biosyntezę peptydoglikanu (mureiny): *glmU*, *murA* i *murB*. Grubość warstwy tego składnika ściany komórkowej stanowi zasadniczą różnicę między bakteriami Gram-dodatnimi, a Gram-ujemnymi. Bakterie Gram-dodatnie posiadają więcej peptydoglikanu i jest on wielowarstwowy, natomiast bakterie Gram-ujemne mniej i tworzy on tylko jedną warstwę. Z tego powodu UA silniej hamuje

wzrost bakterii Gram-dodatnich niż Gram-ujemnych. Wartość MIC wynosiła 64 µg/ml (Park et al. 2015).

Badania dowiodły, że działanie przeciwbakteryjne UA wynika wprost z jego właściwości oksydacyjnych. UA może generować wytwarzanie w komórkach bakterii reaktywnych form tlenu (zwłaszcza anionorodnika ponadtlenkowego i rodnika hydroksylogowego), które powodują zwiększoną aktywność łańcucha transportu elektronów, a w konsekwencji stres oksydacyjny, peroksydację lipidów i utlenianie deoksyrybozy w DNA, co prowadzi do śmierci komórki bakteryjnej. UA wykazywał znaczącą aktywność przeciwbakteryjną wobec szczepów *E. coli*, *P. aeruginosa* i *S. aureus*. Wartości MIC wobec tych szczepów bakterii mieściły się w zakresie 64-256 µg/ml, natomiast wartości MBC w granicach 256-512 µg/ml. Zaobserwowano również znaczący spadek przeżywalności przy wzroście wskaźników stresu oksydacyjnego komórek bakteryjnych (Oloyede et al. 2017).

E. faecalis jest bakterią Gram-dodatnią wywołującą ZUM zwłaszcza u pacjentów zacewnikowanych, oporną na wiele antybiotyków, m.in. gentamycynę, nitrofurantoinę, ampicylinę i trimetoprim/sulfametoksazol. MIC dla UA wobec 10 klinicznych szczepów *E. faecalis* wynosił 32, 64, 128, 256 i 512 µg/ml. W badaniu wpływu UA na wzrost form planktonowych *E. faecalis* największą aktywność UA zauważono po 6 godz. inkubacji, kiedy to przeżycie bakterii zmniejszyło się 780-krotnie w stosunku do próby kontrolnej. Wykazano również zmiany wielkości i rozmieszczenia komórek bakteryjnych hodowanych w obecności UA, były one większe i tworzyły agregaty zamiast łańcuchy w porównaniu do bakterii z próby kontrolnej. Prawdopodobnie UA zakłóca procesy podziału komórek co może powodować zmiany fenotypowe w morfologii komórek, np. zwiększenie ich średnicy, występowanie nieregularnych agregatów. Ponadto UA znacznie zmniejszył (a w niektórych przypadkach całkowicie zahamował) zdolność szczepów *E. faecalis* do syntezy DNazy oraz enzymów pozakomórkowych uszkadzających tkanki gospodarza (lipazy, lecytynazy, żelatynazy) i toksyn (hemolizyny). Działając w ten sposób, UA niszczy integralność błony komórkowej i powoduje jej dysfunkcję, ponieważ takie uszkodzenie może wpłynąć na transport enzymów i toksyn z bakterii na zewnątrz, do środowiska (Wojnicz et al. 2017).

Enterobacter cloacae jest Gram-ujemną bakterią zdolną do wywoływania oportunistycznych ZUM, jest także częstym czynnikiem etiologicznym zapalenia dolnych dróg oddechowych i opon mózgowo-rdzeniowych. W szczególności pojawienie się szczepów *E. cloacae* opornych na karbapenemy (CREC) stanowi ogromne zagrożenie dla zdrowia publicznego. UA wywiera silne działanie bakteriobójcze na formy planktonowe CREC, MIC dla UA przeciwko czterem szczepom CREC wynosił 100 µg/ml, podczas gdy MIC karbapenemów wynosił odpowiednio: imipenem 32µg/ml), meropenem 64 µg/ml, ceftazydym 256 µg/ml. Ponadto wyniki zdecydowanie sugerują, że leczenie UA upośledza integralność błony komórkowej komórek CREC. Ekspozycja na UA doprowadziła bowiem do uszkodzenia i hiperpolaryzacji błon komórkowych bakterii, co zwiększyło ich przepuszczalność i doprowadziło do zmniejszenia wewnątrzkomórkowego stężenia ATP, pH oraz potencjału błonowego. Leczenie UA zmieniło morfologię komórek CREC, były mniej jednorodne pod względem wielkości, miały zapadniętą powierzchnię bez wyraźnych krawędzi komórek. Zaobserwowano wyższy stopień deformacji błony komórkowej i ścianę komórkową w stanie litycznym, co wskazuje na degradację DNA i białek. Wykazano kompletność zniszczenia warstwy peptydoglikanu i martwicę (wyciek wewnątrzkomórkowy) (Qian et al. 2019).

3.2 Działanie przeciwbakteryjne wobec biofilmów bakteryjnych

UA wyizolowany z liści jednego z gatunków hurmy hebanowej (*Diospyros dendo*) już w stężeniu 10 µg/ml wykazywał znaczną aktywność przeciwbakteryjną wobec 24-godzinnych biofilmów jednogatunkowych, tworzonych przez szczepy *E. coli* (zmniejszenie wartości gęstości optycznej OD o 72%), *P. aeruginosa* (o 87%) oraz *Vibrio harveyi* (o 57%), zarówno na płytkach titracyjnych 96-dółkowych jak i w komorze o ciągłym przepływie. Dla porównania, UA w stężeniach 10 i 30 µg/ml nie hamował wzrostu w/w szczepów rosnących w zawieszynie, tj. form planktonowych. Stwierdzono również, że UA nie indukował ani nie tłumił mechanizmu wyczuwania kworum (*ang. quorum sensing*). UA w stężeniach 10 i 30 µg/ml indukował geny chemotaksji (*cheA*, *motAB*, *tap*

i *tsr*) geny szoku cieplnego (*hslSTV*, *htpG* i *mopB*) oraz geny biorące udział w transporcie (*dcuA*, *emrK* i *malE*). Promowanie ruchu komórek poprzez indukcję ekspresji *motAB* czyni komórki zbyt ruchliwymi, aby mogły pozostać stabilne w środowisku biofilmu i skutkuje zmniejszeniem jego tworzenia. Odwrotnie, niska ruchliwość komórek sprzyja koniugacji, która promuje rozwój biofilmu. Potwierdzeniem takiego mechanizmu działania UA jest fakt, że nie wykazywał on wpływu na produkcję biofilmu przez mutanta pozbawionego *motAB*. W stężeniach 10 i 30 µg/ml UA tłumiał gen *cysDJK*, należący do regulonu cysteinowego i regulowany przez CysB. Ścieżka CysB jest potencjalnym szlakiem docelowym UA i innych TP. Badania wykazały, że UA może modulować ekspresję genu *cysB* u *E. coli*. Izogeniczny mutant *cysB* wytwarzał biofilm inaczej niż typ dziki. Białko CysB jest regulatorem transkrypcji LysR, który kontroluje ekspresję genów biorących udział w biosyntezie cysteiny i metabolizmie siarki. Ponadto wykazano, że CysB jest zaangażowane w kontrolę przyzwyczajania kwasowego u *E. coli* i odpowiedzi na O-acetylo-L-serynę. Mutacja *cysB* zwiększyła tworzenie biofilmu 2-10-krotnie w porównaniu do izogenicznego szczepu *cysB*. Metabolizm siarki (poprzez *cysB*) wpływa hamująco na tworzenie biofilmu (przy braku UA) (Ren et al. 2005).

Biofilmy jednogatunkowe, utworzone przez szczepy *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* i *S. epidermidis*, charakteryzowały się kilkukrotnie większą opornością na UA, w porównaniu z komórkami planktonowymi. Podawanie UA łącznie z antybiotykami β-laktamowymi (ampicyliną i oksacyliną), spowodowało spadek wartości MBIC (*ang. Minimum Biofilm Inhibitory Concentration*) wobec w/w szczepów bakterii (z wyjątkiem *P. aeruginosa*), co stanowi kolejny dowód działania synergistycznego UA i tych antybiotyków (Kurek et al. 2012).

Biofilm tworzony przez gronkowce koagulazo-ujemne (*S. aureus*) na powierzchniach abiotycznych takich jak zastawki protetyczne, jest częstym powikłaniem pooperacyjnym i stanowi przyczynę zagrażającego życiu infekcyjnego zapalenia wsierdza. Zbadano adhezję *S. aureus* na abiotycznej powierzchni z tworzywa sztucznego oraz na powierzchni pokrytej fibrynogenem, fibronektyną, kolagenem, tj. przypominającej protezę zastawki serca. Wartość MIC wynosiła 250 µg/ml, jednak ze względu na specyficzny przebieg patogenezы infekcyjnego zapalenia wsierdza jej osiągnięcie w miejscu zapalenia jest mało prawdopodobne. Antyadhezyjne działanie UA spowodowało znaczne ograniczenie tworzenia 24-godzinnego biofilmu UA w stężeniu ¼ MIC ograniczał adhezję bakterii do powierzchni powleczonej kolagenem o 73,2%, fibronektyną o 58,8%, a fibrynogenem o 65,9%. Procent zahamowania adhezji gronkowca do powierzchni obojętnej tj. niepoleczonej przez ½ lub ¾ MIC wahał się od 14,2% do 72,4% w zależności od szczepu. (Micota et al. 2014).

Przeprowadzono badania określające wpływ UA (także w kombinacji z ciprofloksacyną) na proces formowania i eradykacji biofilmu na polistyrenowych płytkach titracyjnych i na silikonowych cewnikach urologicznych. W badaniach tych wykorzystano UPEC, posiadające geny kodujące produkty istotne w procesie tworzenia biofilmu. Ilość tworzonego biofilmu oszacowano na podstawie wartości OD odczytywanych po upływie określonych czasów inkubacji w obecności badanych związków. Antybiofilmowy efekt mieszaniny UA o stężeniu 50 µg/ml z ciprofloksacyną zaobserwowano po 48 godz. inkubacji na cewnikach urologicznych, natomiast już po 12 godz. inkubacji na płytkach titracyjnych, gdzie był on kontynuowany po 48, 72 i 96 godz. Najmniejszą liczbę żywych komórek w biofilmie (mierzoną wartością CFU/ml) odnotowano po 72 i 96 godz. inkubacji. Obserwacja komórek w mikroskopie fluorescencyjnym po zabarwieniu DAPI wykazała zahamowanie tworzenia agregatów bakteryjnych po 96 godz. Mieszanina UA i ciprofloksacyny zredukowała liczbę bakterii w 24-godzinnym biofilmie do 29% (Wojnicz et al. 2015).

Propionibacterium acnes jest oportunistycznym szczepem bakterii Gram-dodatnich, opornym na wiele antybiotyków z grupy tetracyklin i makrolidów (m.in. erytromycynę i klindamycynę). Wzrasta w postaci biofilmu na materiałach biomedycznych (implantach) oraz w mieszkach włosowych skóry, stanowiąc przyczynę trądziku pospolitego. Wyniki potwierdzają niską aktywność przeciwbakteryjną erytromycyny i klindamycyny wobec biofilmu tworzonego przez niektóre szczepy *P. acnes* nawet w wysokich stężeniach (odpowiednio 0,5% i 1%), co prowadzi do podobnego zmniejszenia populacji biofilmu niezależnie od podatności danego szczepu określonej oznaczeniem MIC. UA wyizolowany z liści mirtu zwyczajnego (*Myrtus communis*) wykazywał

znaczną aktywność przeciwbakteryjną wobec szczepów *P. acnes* niewrażliwych na erytromycynę i klindamycynę, rosnących w zawiesinie jak i tworzących biofilm. UA hamował tworzenie biofilmu i zmniejszał ustrukturyzowany 48-godzinny biofilm *P. acnes* w zakresie stężeń od 0,1% do 0,001% (tj. od 1000 do 10 mg/l), co odpowiadało wartościom MIC obserwowanym na komórkach planktonowych. UA o stężeniu 0,001% (w którym posiadał bardzo niską aktywność przeciwbakteryjną), został połączony z erytromycyną (1000 mg/l) lub klindamycyną (500 mg/l) i sprawdzony na 48-godzinnym biofilmie *P. acnes*. W takich kombinacjach UA przywracał szczepom *P. acnes* wrażliwość na erytromycynę lub klindamycynę, był również skuteczny przeciwko szczepom opornym na te antybiotyki (Feuillolay et al. 2016).

S. marcescens jest bakterią Gram-ujemną, która powoduje m.in. ZUM, zwłaszcza związane z cewnikiem moczowym, na którym tworzy biofilm. Poddany działaniu UA o stężeniu 30 µg/ml biofilm wytworzony przez kliniczny izolat *S. marcescens* wykazał minimalną, ale nieistotną statystycznie zmianę biomasy (Ray et al. 2017).

Kolejne badania wykazały brak znaczących różnic wartości OD tj. brak redukcji słabego i umiarkowanego biofilmu *E. faecalis* podczas inkubacji z UA przez cały czas prowadzenia obserwacji (10 dni). Przeżywalność bakterii w masie biofilmu, tj. liczba komórek bakteryjnych na ml (CFU/ml) była oznaczana po każdym czasie inkubacji i była istotnie zmniejszona w kulturach zawierających UA w porównaniu do prób kontrolnych. Wystąpiły statystycznie istotne różnice w CFU/ml między biofilmami traktowanymi UA, a nietraktowanymi po 1, 2 i 3 dniu inkubacji (Wojnicz et al. 2017).

Najnowsze badania wykazały, że UA skutecznie zaburza integralność błony komórkowej, hamuje tworzenie biofilmu przez CREC, a oprócz tego inaktywujące komórki CREC obecne w istniejącym biofilmie. Już pod wpływem 1/64 MIC, tworzenie biofilmu CREC zostało zahamowane o 52,8%, a ponad 90% biofilmu zostało zahamowane, gdy stężenie UA było większe niż 1/32 MIC. Zaobserwowano zmniejszenie żywotności komórek tworzących biofilm oraz znaczne ich rozproszenie w matrycy biofilmu, jednak niektóre komórki osadzone głębiej w strukturze biofilmu pozostały nadal nienaruszone (Qian et al. 2019).

4. Podsumowanie

W cytowanych powyżej wynikach badań istnieje prawidłowość, że wartości MIC dla UA oznaczane wobec bakterii Gram-ujemnych były wyższe niż w przypadku szczepów Gram-dodatnich. Rozbieżność ta jest związana z różnicami w budowie ścian komórkowych obu rodzajów bakterii. W osłonach bakterii Gram-ujemnych, w przeciwieństwie do Gram-dodatnich, wyróżnia się zewnętrzną błonę, która może utrudniać penetrację UA do wnętrza komórki bakteryjnej (Acebey-Castellon et al. 2011, Park et al. 2015, Wojnicz et al. 2015, Wojnicz et al. 2017).

Zasadniczym mechanizmem przeciwbakteryjnego działania UA jest aktywność antyadhezyjna, czyli osłabienie zdolności przylegania bakterii do komórek uropitelium. Utrudnienie adhezji bakteriom pod wpływem UA zachodzi poprzez zmiany morfologiczne w komórkach oraz zmniejszenie ekspresji czynników wirulencji takich jak hydrofobowość, obecność fimbrii typu P oraz fimbrii curli. Także zmniejszając zdolność do ruchu bakterii oraz zmieniając morfologię komórek bakteryjnych, UA upośledza możliwość dalszej kolonizacji, przez co działa antybakteryjnie (Wojnicz et al. 2013a, Wojnicz et al. 2013b).

Mechanizm molekularny aktywności farmakologicznej TP nie jest całkowicie wyjaśniony; jednak jednym z najważniejszych etapów jest włączenie ich cząsteczki do błony mitochondrialnej lub błony komórki bakteryjnej. W związku z tym, prawdopodobny molekularny mechanizm działania UA, leżący u podstaw jego aktywności przeciwbakteryjnych polega na bezpośrednim wpływie na budowę i właściwości biofizyczne błon komórkowych. Dzięki strukturalnemu podobieństwu do cholesterolu, UA wchodzi w interakcję z błoną i lokalizuje się bliżej hydrofilowych „główek” niż hydrofobowych „ogonów” w dwuwarstwie fosfolipidowej. Dotychczasowe badania dowiodły, że UA zmienia organizację błon bogatych w 1,2-dipalmitoil-3-sn-glicero-3-fosfatydylocholinę (DPPC) i DPPC-cholesterol, poprzez wpływ na konformację *all-trans* łańcuchów acylowych w fosfolipidach, co skutkuje ich przechyleniem i tworzeniem w błonie struktur lipidowych o wysokiej krzywiznie, prawdopodobnie odwróconych miceli. Ponadto, wchodzenie w interakcje z bogatymi w cholesterol

domenami błonowymi nadaje UA zdolność do wpływania na lokalizację, a zatem i na funkcję fizjologiczną wielu białek sygnałowych związanych z błoną (Prades et al. 2011).

W interakcji z anionowymi fosfolipidami błonowymi modelowej wewnętrznej błony *E. coli* (monowarstwa Langmuira), UA jest antagonistą α -tokoferolu, pomimo że związki te mają odmienną budowę, segregują do innych domen błonowych gdzie oddziałują z innymi lipidami. Wbudowanie UA w błonę bakteryjną jest korzystne energetycznie i blokuje płynność tej błony, natomiast α -tokoferol zmniejsza lub całkowicie eliminuje ten efekt, co prawdopodobnie jest przyczyną braku działania przeciwbakteryjnego. Stosowanie witaminy E oraz innych witamin przeciwutleniających jest zatem niekorzystne w leczeniu infekcji bakteryjnych (Broniatowski et al. 2015).

Niska biodostępność UA *in vivo* ogranicza jego zastosowanie kliniczne, dlatego w ostatnich latach przeprowadzono modyfikacje strukturalne UA mające na celu poprawę jego aktywności biologicznej i biodostępności. Jednym z badań było zaprojektowanie i zsyntetyzowanie nowych pochodnych karbazolowych UA oraz oznaczenie ich MICs wobec 4 szczepów bakterii: dwóch Gram-dodatnich (*B. subtilis*, *S. aureus*) i dwóch Gram-ujemnych (*E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*). Większość zsyntetyzowanych pochodnych UA wykazała działanie hamujące zarówno wobec bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych, przyjmując wartości MIC 3,9-15,6 $\mu\text{g/ml}$, zbliżone do wartości kontroli dodatniej tj. antybiotyku amikacyny. Wyniki te dowiodły, że połączenie ugrupowania karbazolowego z cząsteczką UA zmienia właściwości fizykochemiczne, m. in. zwiększa rozpuszczalność w wodzie, co prowadzi do poprawy biodostępności i aktywności biologicznej w porównaniu z macierzystą cząsteczką UA (Gu et al. 2015).

Słaba rozpuszczalność w wodzie również ogranicza farmakologiczne zastosowanie UA. W celu poprawy rozpuszczalności i biodostępności, UA został zamknięty w nanostrukturach poliuretanowych, które działają jak nośniki leków, a następnie potwierdzono ich działanie przeciwbakteryjne wobec szczepów *Bacillus cereus* i *B. subtilis*. Otrzymana wartość MIC tj. 4570 $\mu\text{g/ml}$ była bardzo wysoka co oznacza, że kapsułkowanie zmniejszyło działanie przeciwbakteryjne UA w porównaniu do czystego UA. Potrzebne jest przeprowadzenie badań *in vivo* w celu oceny możliwości wydzielenia UA z kapsułki w wyniku aktywności metabolicznej komórki bakteryjnej (Oprean et al. 2016).

5. Literatura

- Acebey-Castellon IL, Voutquenne-Nazabadioko L, Doan Thi Mai H, et al. (2011) Triterpenoid saponins from *Symplocos lancifolia*. J Nat Prod, 74: 163–8
- Broniatowski M, Flasiński M, Hąc-Wydro K (2015) Antagonistic effects of α -tocopherol and ursolic acid on model bacterial membranes. Biochim Biophys Acta, 1848: 2154–62
- Chung PY, Navaratnam P, Chung LY (2011) Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 10:25
- Feuillolay C, Pecastaings S, Le Gac C, et al. (2016) A *Myrtus communis* extract enriched in myrtucummulones and ursolic acid reduces resistance of *Propionibacterium acnes* biofilms to antibiotics used in acne vulgaris. Phytomedicine, 23(3): 307–15
- Gu W, Hao Y, Zhang G, et al. (2015) Synthesis, in vitro antimicrobial and cytotoxic activities of new carbazole derivatives of ursolic acid. Bioorg Med Chem Lett, 25: 554–7
- Horiuchi K, Shiota S, Hatano T, et al. (2007) Antimicrobial activity of oleanolic acid from *Salvia officinalis* and related compounds on vancomycin-resistant enterococci (VRE). Biol Pharm Bull, 30(6): 1147–9
- Jaroniewski W (1986) Rośliny lecznicze polskich lasów. Mącznica lekarska *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Sprengl. Wszechświat, 87(6): 135–6
- Jäger S, Trojan H, Kopp T, et al. (2009) Pentacyclic triterpene distribution in various plants – rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. Molecules, 14: 2016–31
- Jesus JA, Lago JH, Laurenti MD, et al. (2015) Antimicrobial activity of oleanolic and ursolic acids: an update. Evid Based Complement Alternat Med, 2015:620472
- Kałwa K (2016) Dobroczynne niedźwiedzie grono. Panacea, 4/1(57/58): 36–7

- Kim S-G, Kim MJ, Jin D, et al. (2012) Antimicrobial Effect of Ursolic Acid and Oleanolic Acid against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Korean J Microbiol, 48(3): 212–5
- Kurek A, Nadkowska P, Pliszka S (2012) Modulation of antibiotic resistance in bacterial pathogens by oleanolic acid and ursolic acid. Phytomedicine, 19(6): 515–9
- López-Hortas L, Pérez-Larrán P, González-Muñoz MJ, et al. (2018) Recent developments on the extraction and application of ursolic acid. A review. Food Res Int, 103: 130–49
- Mallavadhani UV, Mahapatra A, Jamil K et al. (2004) Antimicrobial activity of some pentacyclic triterpenes and their synthesized 3-O-lipophilic chains. Biol Pharm Bull, 27(10): 1576–9
- Micota B, Sadowska B, Podsek A i in. (2014) *Leonurus cardiaca* L. herb - a derived extract and an ursolic acid as the factors affecting the adhesion capacity of *Staphylococcus aureus* in the context of infective endocarditis. Acta Biochim Pol, 61(2): 385–8
- Moodley R, Chenia H, Jonnalagadda SB, et al. (2011) Antibacterial and anti-adhesion activity of the pentacyclic triterpenoids isolated from the leaves and edible fruits of *Carissa macrocarpa*. J Med Plant Res, 5(19): 4851–8
- Navina R, Lee YG, Kim SM (2017) Molecular Biological Roles of Ursolic Acid in the Treatment of Human Diseases. Curr Bioact Compd, 13(3): 177–85
- Oloyede HOB, Ajiboye HO, Salawu MO, et al. (2017) Influence of oxidative stress on the antibacterial activity of betulin, betulinic acid and ursolic acid. Microb Pathog, 111: 338–44
- Oprean C, Zambori C, Borcan F, et al. (2016) Anti-proliferative and antibacterial *in vitro* evaluation of the polyurethane nanostructures incorporating pentacyclic triterpenes. Pharm Biol, 54(11): 2714–22
- Park SN, Ahn SJ, Kook JK (2015) Oleanolic acid and ursolic acid inhibit peptidoglycan biosynthesis in *Streptococcus mutans* UA159. Braz J Microbiol, 46(2): 613–7
- Prades J, Vögler O, Alemany R, et al. (2011) Plant pentacyclic triterpenic acids as modulators of lipid membrane physical properties. Biochim Biophys Acta, 1808: 752–60
- Qian W, Li X, Shen L, et al. (2019) Antibacterial and antibiofilm activity of ursolic acid against carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae*. J Biosci Bioeng, [Epub ahead of print]
- Ray C, Shenoy AT, Orihuela CJ, et al. (2017) Killing of *Serratia marcescens* biofilms with chloramphenicol. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 16:19
- Ren D, Zuo R, Gonzalez Barrios AF, et al. (2005) Differential gene expression for investigation of *Escherichia coli* biofilm inhibition by plant extract ursolic acid. Appl Environ Microbiol, 71: 4022–34
- Wojnicz D, Kicia M, Tichaczek-Goska D (2013a) Effect of asiatic and ursolic acids on morphology, hydrophobicity and adhesion of UPECs to uroepithelial cells. Folia Microbiol, 58: 245–52
- Wojnicz D, Tichaczek-Goska D, Kicia M (2013b) Effect of asiatic and ursolic acids on growth and virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* strains. Turk J Biol, 37: 556–64
- Wojnicz D, Tichaczek-Goska D, Kicia M (2015) Pentacyclic triterpenes combined with ciprofloxacin help to eradicate the biofilm formed *in vitro* by *Escherichia coli*. Indian J Med Res, 141: 343–53
- Wojnicz D, Tichaczek-Goska D, Korzekwa K, Kicia M, Hendrich A (2017) Anti-enterococcal activities of pentacyclic triterpenes. Adv Clin Exp Med, 26(3): 483–90

17. Antyutleniacze, ich rola w życiu człowieka

Antioxidants, how important they are in human life

Klaudia Woźniak

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

Opiekun naukowy: prof. dr hab. Lucyna Hołysz

Klaudia Woźniak: klaudia.wozniak@poczta.umcs.lublin.pl

Słowa Kluczowe: wolne rodniki, antyutleniacze, stres oksydacyjny

Streszczenie

Wiele czynników, zarówno środowiskowych jak i związanych z metabolizmem człowieka, wpływa na powstawanie wolnych rodników. Generowany w wyniku ich działania stres oksydacyjny wywiera negatywne skutki na zdrowie i życie, między innymi prowadzi do mutacji komórek, tworzenia nowotworów, degradacji błon biologicznych oraz starzenia się organizmu. W celu przeciwdziałania tym procesom niezbędne jest przyjmowanie antyutleniaczy, które hamują lub całkowicie zapobiegają powstawaniu wolnych rodników. Przeciwtleniacze mogą być pochodzenia naturalnego (np. witaminy A, C, E) lub syntetycznego (np. pochodne kwasu galusowego).

1. Wolne rodniki i stres oksydacyjny

Wolne rodniki początkowo stosowane były do opisywania związków pośrednich skomplikowanych reakcji, zarówno w chemii organicznej jak i nieorganicznej (początki XX wieku). Już w połowie tego wieku naukowcy stawiali hipotezy, że cząstki te mogą odgrywać znaczącą rolę w procesach fizjologicznych, w których odpowiedzialne są za szkodliwe zmiany w komórce, zwłaszcza w procesie starzenia. Obecnie badacze weryfikują te hipotezy i zdobywają coraz większą wiedzę na temat rodników oraz ich wpływu na funkcjonowanie organizmu człowieka (Kohen i Nyska 2002).

Wolnymi rodnikami nazywamy wysoce niestabilne atomy, cząsteczki lub jony, które mogą istnieć niezależnie z jednym lub większą liczbą niesparowanych elektronów, wykazując aktywność chemiczną wobec innych cząstek (Chen i in. 2012, Carocho i Ferreira 2013).

W organizmach żywych wolne rodniki reprezentowane są głównie przez reaktywne formy tlenu. Najczęściej występujące rodniki tlenowe to ponadtlenkowy, wodoronadtlenkowy, hydroksylowy, oraz niemające niesparowanego elektronu - tlen singletowy i nadtlenek wodoru. Są między innymi produktem ubocznym metabolizmu w mitochondriach, zachodzącego w warunkach tlenowych podczas tworzenia się cząsteczek ATP (jako źródła endogenne). Jedną z podstawowych przyczyn powstawania reaktywnych form tlenu jest ekspozycja na promieniowanie UV, ksenobiotyki, toksyny, leki oraz zanieczyszczenia środowiska (jako źródła egzogenne) (Kohen i Nyska 2002).

Reaktywne formy tlenu wykazują wysoką zdolność do wchodzenia w reakcje ze strukturami komórkowymi. Prowadzi to do konwersji białek komórkowych, wpływając na zmianę ich struktury i działania. Peroksydacja lipidów wywołuje niestabilność błony biologicznej komórki, a zatem również zmianę przepuszczalności oraz jej funkcji, między innymi w aspekcie transportu błonowego. Im więcej wiązań podwójnych występuje w kwasach tłuszczowych, tym łatwiejszy staje się proces utworzenia wolnego rodnika (Chen i in. 2012, Carocho i Ferreira 2013). Modyfikacja cukrów przez wolne rodniki prowadzi do powstania krótkołańcuchowych cząsteczek między innymi aldehydu glikolowego, który jest wysoce podatny na samoutlenienie. W wyniku tego powstaje wolny rodnik ponadtlenkowy, który charakteryzuje się zdolnościami mutagennymi (Carocho i Ferreira 2013). Jest bardzo reaktywną formą, która już w niskich stężeniach powoduje uszkodzenia komórek. Powoduje między innymi degenerację białek we krwi, uszkodzenie kodu DNA, a także lipidów. Rdnik hydroksylowy uważany jest za najbardziej reaktywny z grupy tlenowych rodników. Czas jego życia jest bardzo krótki. Pomimo tego jest silnym utleniaczem i może reagować zarówno ze związkami nieorganicznymi jak i organicznymi (DNA, białka, lipidy, aminokwasy). Anionorodnik

ponadtlenkowy w zależności od pH środowiska, w którym występuje może przyjmować dwie formy: $O_2^{\cdot-}$ lub HO_2^{\cdot} . Druga z form łatwiej penetruje błony komórkowe, z kolei w rozpuszczalnikach organicznych rozpuszczalność $O_2^{\cdot-}$ jest większa, w związku z czym zdolność redukująca jest także zwiększona (Kohen i Nyska 2002). Powstający stres oksydacyjny jest przyczyną uszkodzenia kwasów nukleinowych i modyfikowania kodu genetycznego, niosąc ryzyko rozwoju choroby nowotworowej (Chen i in. 2012, Carocho i Ferreira 2013).

Ze względu na powyższe skutki duże znaczenie ma stosowanie przeciwutleniaczy, chroniących przed negatywnym wpływem wolnych rodników na komórkę.

2. Przeciwutleniacze

Przeciwutleniaczem nazywamy związek, który w niskich stężeniach w porównaniu do stężenia substratu hamuje lub znacznie opóźnia jego utlenianie (Matkowski 2008). Uznawana jest także definicja stanowiąca, że jest to związek, który opóźnia lub całkowicie zapobiega utlenianiu cząsteczki substratu (Carocho i Ferreira 2013). Ponadto, antyutleniacz powinien posiadać zdolność do wychwycenia i neutralizacji wolnych rodników podczas procesu utleniania. Aktywność przeciwutleniająca może przejawiać się jako:

- inhibicja reakcji utleniania,
- synergizm działania w połączeniu z innymi przeciwutleniaczami,
- przekształcanie wolnych rodników w mniej reaktywne,
- inhibicja enzymów prooksydacyjnych.

W organizmie ludzkim procesy przeciwdziałające powstawaniu wolnych rodników oparte są na enzymatycznych oraz nieenzymatycznych reakcjach. Do przeciwutleniaczy enzymatycznych można zaliczyć peroksydazę glutationową, katalazę oraz dysmutazę ponadtlenkową. Natomiast witamina A, witamina C, witamina E, koenzym Q10, kwas moczowy oraz glutation należą do przeciwutleniaczy nieenzymatycznych.

Witamina A należy do grupy karotenoidów, które występują w żółtych, pomarańczowych i czerwonych pigmentach owoców. Witamina ta jest wytwarzana w wątrobie w wyniku rozkładu β -karotenu. Pełni istotne funkcje w organizmie, między innymi w przemianach białek oraz lipidów. Bierze udział w regeneracji komórek i w procesach wzrostowych. Przyspiesza odnowę naskórka, wzmacniając jego funkcje ochronne, a także zmniejsza utratę wody. Ponadto, stosowana jest w celu spowolnienia starzenia się skóry, zmniejszenia wrażliwości na promieniowanie UV oraz w leczeniu trądziku. Niedobór witaminy w organizmie może powodować ślepotę, suchość gałki ocznej czy nawet zwiększać ryzyko wystąpienia zawału (Podsętek 2007).

Witamina C jest rozpuszczalnym w wodzie antyoksydantem, neutralizującym wolne rodniki, głównie w częściach budulcowych skóry. Równocześnie bierze udział w procesie odzyskiwania witaminy E. Ponadto, wspomaga produkcję elastyny oraz zapobiega powstawaniu przebarwień na skórze. Dowiedziono, że podanie tylko 1% witaminy C powoduje wzrost produkcji kolagenu (Chen i in. 2012).

Witamina E, pod której nazwą kryją się między innymi tokoferole, jest naturalnym składnikiem błon biologicznych, gdzie pełni funkcje antyutleniające. Występują cztery izomery tokoferolu, tj. α , β , γ oraz δ , z których α -tokoferol (Tab.2) wykazuje największą aktywność antyutleniającą (aktywność $\alpha > \beta > \gamma > \delta$). Aktywność formy α jest dwukrotnie większa niż formy β i γ oraz stukrotnie większa niż formy δ . Witamina E reaguje z rodnikami lipidowymi na granicy faz błona/woda, gdzie przekazuje wodór do rodnika lipidowego. Poza tym, przeprowadzone zostały badania potwierdzające fakt, że tokoferole (podobnie jak cholesterol) mogą stabilizować struktury błonowe, poprzez modulowanie ich płynności, a tym samym przepuszczalności dla małych jonów lub cząsteczek (Blokchina i in. 2003). Istnieje również możliwość zsyntetyzowania α -tokoferolu i wtedy związek oznaczony jest jako dl- α -tokoferol. Syntetyczny związek w rzeczywistości nie jest czystą substancją, a mieszaniną czterech racematów. Tab.1 przedstawia zestawienie nazwy chemicznej i zwyczajowej tokoferoli.

Tab. 1. Formy i nazwy tokoferoli

Nazwa zwyczajowa	Nazwa chemiczna
tokol	2-metylo-2-(4',8',12'-trimetylotridecylo)-chroman-6-ol
α -tokoferol	5,7,8-trimetylotokol
β -tokoferol	5,8-dimetylotokol
γ -tokoferol	7,8-dimetylotokol
δ -tokoferol	8-metylotokol

Tab. 2. α -tokoferol dostępny w sprzedaży



Koenzym Q10 występuje we wszystkich błonach i komórkach, odgrywając istotną rolę w procesie oddychania i metabolizmie komórkowym. Jego działanie opiera się na hamowaniu tworzenia się lipidowych rodników nadtlenkowych. Dodatkowo wspomaga on regenerację witaminy E (Podśątek 2007).

Kwas moczowy jako końcowy produkt metabolizmu w ludzkim organizmie zostaje przefiltrowany przez nerki i ponownie wchłaniany. Dzięki temu zapobiega nadprodukcji rodników powstałych w wyniku lizy erytrocytów. Ponadto, chroni przed chorobą niedokrwienną serca (Podśątek 2007).

Flawonoidy należą do szerokiej grupy polifenoli. Są obecne w warzywach, owocach, ich nasionach, łodygach oraz korzeniach. Występują głównie w postaci aglikonu lub jako jego pochodne. Flawonoidy wykazują działanie przeciwucukrzycowe, przeciwmiażdżycowe, przeciwnowotworowe, przeciwutleniające, a także przeciwzapalne. Powyższe właściwości farmakologiczne przypisuje się ich zdolności do modyfikacji błony komórkowej oraz wiązaniu z odpowiednimi białkami. W wyniku działania flawonoidów błona staje się bardziej lub mniej płynna, przez co zmienia się jej aktywność biologiczna (Selvaraj i in. 2015).

Wartym omówienia przykładem syntetycznego antyutleniacza jest galusan laurylu. Jest to ester alkoholu laurylowego (*n*-dodecyłowego) i kwasu galusowego. Istnieją hipotezy, że galusan jest hydrolizowany w przewodzie pokarmowym, a powstałe w wyniku rozpadu kwas galusowy i alkohol laurylowy nie wykazują właściwości toksycznych dla organizmu. Galusan laurylu ma charakter hydrofobowy, co związane jest z obecnością łańcucha alkilowego. Podobnie jak kwas galusowy ma zdolność do oddawania atomu wodoru do rodnika nadtlenkowego, przeciwdziałając peroksydacji lipidów. Oprócz tego, jego aktywność przejawia się w hamowaniu działania enzymu biorącego udział w powstawaniu kwasu moczowego (Kubo i in. 2002, Cusola i in. 2015). Ma także wpływ na autooksydację i enzymatyczną peroksydację kwasu linolenowego (Kubo i in. 2002, Cusola i in. 2015). Chroni także czerwone krwinki przed stresem oksydacyjnym (podczas gdy sam kwas w podobnych warunkach nie wykazuje takich właściwości). Dodatkowo galusan laurylu szeroko stosowany jest w piekarnictwie. (Nanditha i Prabhasankar 2008).

Antyutleniacze są szeroko stosowane w medycynie. Podczas przeszczepu organów konieczne jest zamknięcie przepływu krwi w dochodzących do organu naczyniach krwionośnych. Powoduje to niedotlenienie komórek, które staje się źródłem powstawania reaktywnych form tlenu. Procesy utleniania zachodzące w mitochondriach oraz osłabienie działania układu immunologicznego

odgrywają kluczową rolę w uszkodzeniu i zmianie DNA, a to prowadzi do utrudnienia przyjęcia przeszczepu przez organizm ludzki. Działanie ochronne przed niedokrwieniem (a co za tym idzie powstawaniem wolnych rodników) wykazuje wodór. Z drugiej jednak strony może przyczynić się do zmniejszenia żywotności przeszczepianego organu (Shi i Xue 2016, Kubo i in. 2010).

Zbadano, że istotne jest podawanie wodoru przy przeszczepie płuc lub wątroby. Jednym z głównych źródeł reaktywnych form tlenu są mitochondria, które są wyjątkowo podatne na uszkodzenia oksydacyjne. Uszkodzenia takie może powodować zaburzenie przepływu elektronów i sprzyjać tworzeniu się nadtlenu. Powyższy proces wpływa na przenikanie przez błony mitochondriom podczas niedokrwienia powodując, że stres oksydacyjny jest bardzo duży. W celu ochrony integralności mitochondriów podczas niedokrwienia stosowana jest między innymi melatonina, kwas askorbinowy lub witamina E (Shi i Xue 2016, Kubo i in. 2010).

3. Przegląd literatury

- Aoki HBP, Morato LFC, Pavinatto FJ, Nobre TM, Constantino CJL, Oliviera ON Jr. (2016) Molecular-level modifications induced by photo-oxidation of lipid monolayers interacting with erythrosine. *Langmuir* 32: 3766-3773
- Bhendrich A (2006) Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta Pharmacologica Sinica* 27 (1): 27-40
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany* 91: 179-194
- Budilarto ES, Kamal-Eldin A (2015) The supramolecular chemistry of lipid oxidation and antioxidation in bulk oils. *European Journal of Lipid Science and Technology* 117: 1095-1137
- Carocho M, Ferreira ICFR (2013) A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology* 51: 15-25
- Chen LBA, Hu JYMD, Wang SQMD (2012) The role of antioxidants in photoprotection: A critical review. *Journal of the American Academy of Dermatology* 67: 1013-1024
- Das J, Ramani R, Suraju MO (2016) Polyphenol compound and PKC signalling. *Biochimic et Biophysica Acta* 1860: 2107-2121
- Garrec J, Monari A, Assfeld X, Mir LM, Tarek M (2014) Lipid peroxidation in membranes: the peroxy radical does not “float”. *Journal of Physical Chemistry Letters* 5 (10): 1653-1658
- Kohen R, Nyska A (2002) Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology* 30 (6): 620-650
- Kubo I, Masuoka N, Xiao P, Haraguchi H (2002) Antioxidant activity of dodecyl gallate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 3533-3539
- Kubo I, Masuoka N, Ha TJ, Shimizu K, Nihei K (2010) Multifunctional antioxidant activities of alkyl gallates. *The Open Bioactive Compounds Journal* 3: 1-11
- Ladas EJ, Jacobson JS, Kennedy DD, Teel K, Fleischauer A, Kelly KM (2004) Antioxidants and cancer therapy: A systematic review. *Journal of Clinical Oncology* 22 (3): 517-528
- Matkowski A (2008) Plant in vivo culture for the production of antioxidants – A review. *Biotechnology Advances* 26: 548-560
- Maritim AC, Sanders RA, Watkins III JB (2003) Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 17 (1) 24-38
- Oteiza PI, Erlejtman AG, Vestraeten SV, Keen CL, Fraga CG (2005) Flavonoid-membrane interactions: A protective role of flavonoids at the membrane surface? *Clinical and Developmental Immunology* 12 (1): 19-25
- Podsedek A (2007) Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT-Food Science and Technology* 40 (1): 1-11
- Rahimi R, Nkfar S, Larijani B, Abdollahi M (2005) A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 59: 365-373
- Samaranayaka AGP, Li-Chan ECY (2011) Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Food* 3: 229-254

- Sartori KSET, Menegalli FC (2014) Films and edible coatings containing antioxidants- a review. *Brazilian Journal of Food Technology* 17 (2): 98-112
- Shi S, Xue F (2016) Current antioxidant treatments in organ transplantation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, Article ID 8678510, <https://doi.org/10.1155/2016/8678510>

4. Podsumowanie

Reaktywne formy tlenu pochodzące ze źródeł endogennych i egzogennych takich jak promieniowanie UV i zanieczyszczenia mogą uszkadzać DNA, struktury błon lipidowych i białkowych, a także powodować starzenie się skóry lub rozwój komórek rakowych. Pomimo, że organizm ludzki posiada wrodzoną obronę przed wolnymi rodnikami i może neutralizować reaktywne formy tlenu, to miejscowe dostarczanie przeciwutleniaczy może przynieść dodatkowe korzyści. Aby uchronić organizm przed negatywnymi skutkami wolnych rodników stosuje się przeciwutleniacze. Występują one naturalnie w przyrodzie (witaminy A, C, E) lub mogą być zsyntetyzowane. Przeciwutleniacze odgrywają istotną rolę w wielu dziedzinach życia, a w szczególności w inżynierii tkankowej, gdzie wspomagają przyjęcie się przeszczepionego organu oraz zmniejszenie do minimum wystąpienia możliwych powikłań.

5. Literatura

- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany* 91: 179-194
- Carocho M, Ferreira ICFR (2013) A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology* 51: 15-25
- Chen LBA, Hu JYMD, Wang SQMD (2012) The role of antioxidants in photoprotection: A critical review. *Journal of the American Academy of Dermatology* 67: 1013-1024
- Cusola O, Valls C, Vidal T, Tzanov T, Roncero MB (2015) Electrochemical insights on the hydrophobicity of cellulose substrates imparted by enzymatically oxidized gallates with increasing alkyl chain length. *ACS Applied Materials and Interfaces* 25 (7): 13834-13841
- Kohen R, Nyska A (2002) Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology* 30 (6): 620-650
- Kubo I, Masuoka N, Xiao P, Haraguchi H (2002) Antioxidant activity of dodecyl gallate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 3533-3539
- Kubo I, Masuoka N, Ha TJ, Shimizu K, Nihei K (2010) Multifunctional antioxidant activities of alkyl gallates. *The Open Bioactive Compounds Journal* 3: 1-11
- Nanditha B, Prabhasankar P (2008) Antioxidants in bakery products: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 49 (1): 1-27
- Podśedek A (2007) Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT-Food Science and Technology* 40 (1): 1-11
- Selvaraj S, Krishnaswamy S, Devashya V, Sethuraman S, Krishnan UM (2015) Influence of membrane lipid composition on flavonoid-membrane interactions: Implications on their biological activity. *Progress in Lipid Research* 58: 1-13
- Shi S, Xue F (2016) Current antioxidant treatments in organ transplantation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, Article ID 8678510, <https://doi.org/10.1155/2016/8678510>