

**Wybrane zagadnienia z zakresu  
mikrobiologii i innych nauk  
przyrodniczych**



# **Wybrane zagadnienia z zakresu mikrobiologii i innych nauk przyrodniczych**

Redakcja:  
Kinga Kalbarczyk  
Iwona Domina

Lublin 2022

**Wydawnictwo Naukowe TYGIEL składa serdecznie podziękowania  
dla zespołu Recenzentów za zaangażowanie w dokonane recenzje  
oraz merytoryczne wskazówki dla Autorów.**

**Recenzentami niniejszej monografii byli:**

- prof. nadzw. dr hab. Stanisław Pietrzyk
- dr hab. Remigiusz Bąchor
- dr hab. inż. Paweł Krystian Bereś
- dr hab. Ewa Chodurek
- dr hab.inż. Katarzyna Mikołajczyk-Bator, prof. UEP
- dr hab. Katarzyna Niemirowicz-Laskowska
- dr hab. Karolina Szewczyk-Golec, prof. UMK
- dr Artur Banach
- dr n. farm. Anna Biernasiuk
- dr n. farm. Barbara Frydrych
- dr n. biol. Piotr Jeleń

Wszystkie opublikowane rozdziały otrzymały pozytywne recenzje.

Skład i łamanie:  
Monika Maciąg

Projekt okładki:  
Marcin Szklarczyk

Korekta:  
Małgorzata Gabrys

© Copyright by Wydawnictwo Naukowe TYGIEL Sp. z o.o.

ISBN 978-83-67104-35-7

Wydawca:  
Wydawnictwo Naukowe TYGIEL Sp. z o.o.  
ul. Głowackiego 35/341, 20-060 Lublin  
[www.wydawnictwo-tygiel.pl](http://www.wydawnictwo-tygiel.pl)

## Spis treści

Beata Nalepa, Renata Pietrzak-Fiećko, Cristina Juan, Jordi Mañes, Katarzyna Kielczewska	
Mykotoksyny w żywności – charakterystyka, zagrożenia, metody wykrywania i zapobieganie .....	7
Aleksandra Gałuszka, Wojciech Ludwicki	
Wybrane toksyny a funkcjonowanie organizmu człowieka .....	31
Monika Janeczko	
<i>Fusobacterium nucleatum</i> jako bakteria symbiotyczna, oportunistyczna i onkogenna... 40	
Julia Gdowska, Sandra Gębczyńska, Emilia Małkusz, Bartosz Rył	
Rola handlowych olejków eterycznych i ekstraktów z mięty pieprzowej w kontrolowaniu rozwoju glukuronidazo-dodatniego izolatu <i>E. coli</i> 48 .....	51
Sandra Chmielewska, Urszula Czyżewska, Adam Tylicki	
Enzymy jako ważny cel leków przeciwwgrzybiczych .....	61
Anna Konieczna-Molenda	
Porównanie hydrolizy skrobi ziemniaczanej z zastosowaniem $\alpha$ -amylazy natywnej i immobilizowanej na nośnikach polimerowych .....	78
Nataniel Stefanowski, Halina Tkachenko, Natalia Kurhałuk	
Metabolizm i funkcja ceruloplazminy .....	87
Piotr Ziobrowski, Wojciech Zapła	
Analiza mechanizmu retencji kofeiny, kwercetyny oraz fenolu w wybranych układach chromatografii oddziaływań hydrofilowych (HILIC).....	112
Magdalena Zdybel, Adam Orlicki	
Wpływ temperatury na wolne rodniki biopolimeru melaninowego z <i>Sepia officinalis</i>	126
Urszula Klimczak, Agnieszka Mroczek	
Metody badań struktury saponin triterpenowych.....	140
Joanna Malarz, Grzegorz Benke, Katarzyna Leszczyńska-Sejda, Karolina Goc, Karolina Pianowska	
Badania możliwości łągowania kobaltu z polimetalicznego granulatu stopu Cu-Fe-Pb-Co.....	157
Adam Bogacz	
Narażenie na promieniowanie jonizujące i ochrona radiologiczna w badaniach naukowych.....	168
Indeks Autorów .....	177



# Mykotoksyny w żywności – charakterystyka, zagrożenia, metody wykrywania i zapobieganie

## 1. Wstęp

W środowisku naturalnym powstaje wiele toksyn pochodzenia biologicznego. Grzyby mikroskopowe są producentami związków biochemicznych, które mogą powodować zanieczyszczenia surowców i żywności zarówno pochodzenia roślinnego, jak i zwierzęcego. Są one zatem przedmiotem zainteresowania organów ochrony zdrowia publicznego ze względu na ich negatywny wpływ na ludzkie zdrowie. Te toksyczne związki określa się mianem mykotoksyn. Ich poziom zawartości jest jednym z ważniejszych wskaźników jakości większości produktów spożywczych oraz pasz. Mykotoksynami są zatem produkty wtórnego metabolizmu pleśni o działaniu toksycznym nie tylko na inne drobnoustroje, jak antybiotyki, ale także na organizmy wyższe [1]. Toksyny te mogą zanieczyszczać bardzo szeroką gamę surowców i gotowej żywności na każdym etapie łańcucha produkcyjnego [2]. Na zanieczyszczenia mykotoksynami szczególnie narażone są surowce i żywność pochodzenia roślinnego oraz pasze. Skażenia te mogą powstać już w trakcie wegetacji roślin na polu i/lub podczas zbioru w wyniku rozwoju tzw. grzybów polowych (np. *Fusarium spp.*) oraz w trakcie przechowywania, transportu i przetwarzania w wyniku rozwoju m. in. grzybów zwanych przechowalnymi (*Aspergillus spp.* i *Penicillium spp.*) lub innych [3, 4]. Wiele badań wykazało, że surowcami i produktami najczęściej zanieczyszczonymi mykotoksynami, często kilkoma naraz, są kukurydza i przetwory kukurydziane, wszystkie zboża i przetwory zbożowe, płatki, kasze, mąki, makarony, ryż i przetwory ryżowe, owoce (zwłaszcza cytrusy, jabłka i owoce jagodowe), soki owocowe i wina, słód jęczmienny, chmiel i piwo, warzywa, orzechy (zwłaszcza arachidowe), nasiona roślin strączkowych, nasiona roślin oleistych, oleje, margaryny, nasiona kakaowca i kakao, nasiona kawowca i kawa, a także surowce używane w produkcji pasz dla zwierząt oraz wiele innych [5, 6]. Mykotoksyny są najczęściej wytwarzane przez pleśnie z rodzajów *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* i *Alternaria*. Z ekonomicznego i toksykologicznego punktu widzenia – w skali europejskiej i światowej – w związku z powszechną globalizacją handlu żywnością najważniejsze są następujące grupy mykotoksyn: aflatoksyny (AF), ochratoksyny

---

<sup>1</sup> beata.nalepa@uwm.edu.pl, Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności, Wydział Nauk o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie.

<sup>2</sup> renap@uwm.edu.pl, Katedra Towaroznawstwa i Badań Żywności, Wydział Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie.

<sup>3</sup> cristina.juan@uv.es, Laboratory of Food Chemistry and Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia.

<sup>4</sup> jordi.manes@uv.es, Laboratory of Food Chemistry and Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Valencia.

<sup>5</sup> kaka@uwm.edu.pl, Katedra Mleczarstwa i Zarządzania Jakością, Wydział Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie.

(OTA), trichoteceny (deoksyniwalenol, DON, niwalenol, 3-acetylo-DON, 15-acetylo-DON, toksyna T-2, toksyna HT-2 i związki pokrewne), fumonizyny (FM), patulina (PAT) oraz zearalenon (ZON) i jego pochodne [7, 8]. Obecnie ponad 400 związków chemicznych zdefiniowano jako mykotoksyny [9].

Historycznie ujmując problem mykotoksyn, warto przytoczyć kilka przykładów, które w rozumieniu współczesnej nauki jawią się jako bezpośrednie dowody na to, że ich obecność w paszach lub żywności niesie duże zagrożenie zdrowotne zarówno dla ludzi, jak i zwierząt. Trapiące ludzkość nieszczęścia minionych cywilizacji związane były okresowo z nienaturalnie wzmożonym rozwojem patogenów grzybów podstawowych roślin uprawnych. Przykładowo:

- przyczyny wyginięcia Etrusków oraz pomoru w Atenach w V wieku p.n.e. upatruje się w zatruciach zearalenonem wytwarzanym przez *Fusarium* spp. [10];
- w Japonii w końcu XIX wieku stwierdzono toksyczność żółtego ryżu; ale dopiero 70 lat później wykryto toksyczne związki (luteoskirynę, cytryninę i cyteowirydynę) wytwarzane m.in. przez grzyby *Penicillium islandicum* i *Penicillium citreoviride*) jako przyczynę „choroby żółtego ryżu” [11];
- w 1928 r. opisana została, występująca w krajach skandynawskich i w Niemczech, choroba nerek u świń, której przyczyną była ochratoksyna A wytworzona przez *Aspergillus ochraceus*. W połączeniu z cytryniną, kwasem szczawiowym i/lub kwasem penicylinowym – ochratoksyna A była też przyczyną „bałkańskiej endemicznej nefropatii” u ludzi w byłej Jugosławii, Bułgarii i Rumunii [7];
- podczas II wojny światowej w Rosji odnotowano tysiące przypadków zachorowań na „toksyčną białaczkę pokarmową”; przyczyną zatruc była m.in. toksyna T-2 wytworzona przez pleśnie rodzaju *Fusarium*, które rozwinęły się na ziarnach zbóż zebranych dopiero zimą [12];
- niewytlumaczalne gwałtowne zejścia śmiertelne archeologów penetrujących grobowce, np. władców egipskich lub innych nekropolii, wiążą się najprawdopodobniej z wdychaniem ochratoksyny A syntetyzowanej przez *Aspergillus* spp., odpowiedzialnej za ostrą niewydolność nerek i określanej jako tzw. „klątwa faraona” [13].

Pierwsze udokumentowane masowe zatrucia mykotoksynami odnotowano w 1960 r. w Wielkiej Brytanii, gdzie w krótkim czasie padło ponad 100 tys. indyków. Chorobę X, jak ją początkowo nazwano, wywołała toksyna produkowana przez gatunek pleśni *Aspergillus flavus*, od którego toksyna otrzymała nazwę aflatoksyna [14].

Obecnie masowe śmiertelne zatrucia mają charakter wyjątkowy i zazwyczaj lokalny, natomiast długotrwały kontakt konsumenta nawet z bardzo niewielkimi dawkami poszczególnych mykotoksyn może prowadzić do przewlekłych chorób trudnych do zdiagnozowania, a w dłuższej perspektywie do poważnych schorzeń, jak nowotwory nerek czy wątroby.

Z punktu widzenia bezpieczeństwa żywnościowego każdego kraju tematyka związana z mykotoksynami jest bardzo ważna. Dlatego też celem monografii było zebranie najważniejszych informacji na ich temat (zwłaszcza o tych toksynach, które powszechnie mogą występować w żywności lub paszach), wykazanie ich negatywnego oddziaływania na ludzi i zwierzęta oraz omówienie metod ich oznaczania.



## **2. Charakterystyka głównych grup mykotoksyn**

Synteza mykotoksyn przez grzyby jest uwarunkowana genetycznie i związana z pierwszorzędowymi szlakami metabolicznymi, takimi jak metabolizm aminokwasów czy kwasów tłuszczowych, ale fenotypowo determinowana czynnikami środowiskowymi. Najważniejsze z nich to obecność szczepu toksynotwórczego, skład chemiczny substratu, jego konsystencja, obecność w podłożu składników odżywczych (w tym makro- i mikroelementów), obecność substancji sprzyjających syntezie, wilgotność, temperatura, a także obecność mikroorganizmów konkurencyjnych. Wilgotność oraz temperatura wydają się jednak być najważniejszymi czynnikami określającymi podatność surowców i produktów spożywczych na rozwój pleśni i wytwarzanie mykotoksyn. Wilgotność względna powyżej 70%, zaś surowca roślinnego powyżej 15%, stymuluje tworzenie mykotoksyn [9, 15]. Często wartości tych czynników są odmienne od tych optymalnych do rozwoju pleśni [16]. Błędnie sądzi się także, że powstawanie mykotoksyn łączy się jedynie z efektem niewłaściwego przechowywania surowców roślinnych. Narażenie składowanego materiału na kontakt z wilgocią oczywiście sprzyja rozwojowi pleśni i wydzielaniu mykotoksyn, jednakże, jak wspomniano wcześniej, znaczna część tych związków powstaje już w momencie wegetacji roślin. A wbrew obiegowym opiniom, nie tylko ciepło i większa wilgotność sprzyja powstawaniu mykotoksyn, lecz niektóre gatunki produkują je w odpowiedzi np. na długotrwałą suszę [13]. Oznacza to, że grzyby produkują toksyny przede wszystkim w warunkach stresu środowiskowego, kiedy następują gwałtowne zmiany temperatury, wilgotności, dostępności tlenu lub w przypadku działania substancji agresywnych w stosunku do grzybów [10].

Mykotoksyny są związkami niskocząsteczkowymi, które ze względu na swoją budowę chemiczną należą do różnych grup. Są to m. in. pochodne kumaryny, antrachinonu, są też cyklicznymi peptydami, hormonami czy sterydami. Wykazują właściwości słabo polarne, na ogół są też lipofilowe, co powoduje, że kumulują się we frakcjach tłuszczowych roślin i zwierząt [17]. Większość z nich jest także ciepłostabilna i nie ulega degradacji podczas pasteryzacji, a także w wyższych temperaturach. Takie procesy jak smażenie czy gotowanie nie powodują znaczącego spadku zawartości mykotoksyn w żywności, natomiast w większości ulegają degradacji w środowisku alkalicznym oraz pod wpływem działania promieniowania UV [10]. Oznacza to, że przetwarzanie skażonych mykotoksynami surowców żywnościowych stwarza możliwość wystąpienia ich w gotowych produktach, ponieważ związki te mogą się do niego przedostać, jednakże w różnym stopniu, zależnie od rodzaju surowca, a także stosowanych następnie procesów przetwarzania. Na przykład w procesie tłoczenia i ekstrakcji oleju mykotoksyny tylko w nieznacznym stopniu przechodzą do frakcji olejowej, a prawie całkowicie pozostają w śrucie. Dalsza rafinacja oleju usuwa pozostałości toksyn. Przy produkcji kaszki i mąki kukurydzianej ok. 10-20% toksyn przechodziło do tych frakcji, podczas gdy zanieczyszczenie frakcji zarodków i otrąb było wyższe niż w użytym surowcu [18]. Procesy technologiczne – jak czyszczenie, mielenie, warzenie, gotowanie, pieczenie, smażenie, prażenie, płatkowanie, gotowanie alkaliczne czy ekstruzja – pozwalają usunąć 88% występujących w surowcach zbożowych mykotoksyn [19], natomiast klaryfikacja, filtracja czy fermentacja alkoholowa – 46-60% toksyn pochodzących z surowców [20, 21]. Największe ryzyko mogą więc stanowić produkty minimalnie przetworzone i nieprzetworzone wyprodukowane z surowców porażonych pleśniami.

### **3. Drogi wnikania i działanie toksyczne mykotoksyn na organizmy wyższe**

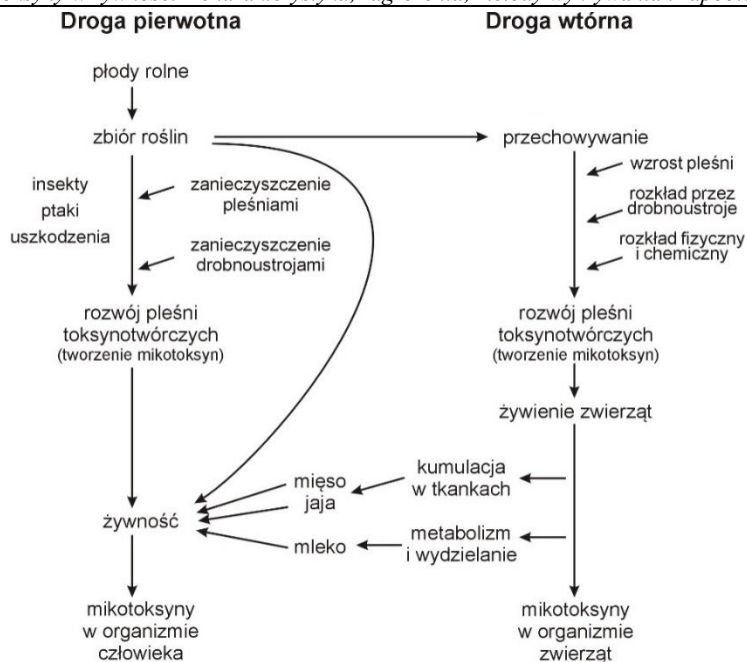
W wyniku współdziałania mikrobiologów, weterynarzy oraz wykorzystania nowoczesnych metod analitycznych ustalono drogi wnikania mykotoksyn do organizmu człowieka, określone jako pierwotną i wtórną (rys. 1).

Drogą pierwotną mykotoksyny dostają się do organizmu człowieka, gdy spożywa on żywność, na której wcześniej rozwijały się gatunki pleśni toksynotwórczych i wytworzyły toksynę lub wiele różnych toksyn. Instynkt samozachowawczy człowieka nie pozwala mu spożywać żywności spleśniałej, lecz jeśli wcześniej surowce były narażone na rozwój grzybów, a mimo to zostały przeznaczone do przetwórstwa, istnieje duże ryzyko występowania w nich mykotoksyn, które zostaną wprowadzone do organizmu wraz z wyprodukowanymi z nich produktami spożywczymi [7]. Poza drogą pokarmową, mykotoksyny mogą przenikać do organizmu ludzkiego przez układ oddechowy i przez skórę (droga inhalacyjna i interdermalna). Ten mechanizm wnikania metabolitów może wystąpić, gdy człowiek przebywa w zawilgoconych pomieszczeniach, w których rozwijają się grzyby toksynotwórcze.

Droga wtórna wiedzie przez organizmy zwierzęce. Pewne ilości toksyn pleśni organizm zwierzęcia unieczynnia i wydalą z płynami fizjologicznymi. Jednakże po przekroczeniu pewnego progu toksyny kumulują się w tkankach miękkich, takich jak wątroba, nerki, tkanka tłuszczowa, a także w mięśniach [17]. Niektóre mykotoksyny w organizmach zwierzęcych ulegają przekształceniu w inną formę chemiczną o słabszych właściwościach toksycznych, np. aflatoksyny B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub> przekształcane są w żwacz krowy do toksyn M<sub>1</sub> i M<sub>2</sub> wydzielanych z mlekiem. Podawanie zwierzętom hodowlanym pasz zanieczyszczonych mykotoksynami zatruwa ich organizmy i otwiera wtórną drogę wnikania toksyn pleśni do organizmu człowieka [7]. Kumulowanie się toksyn wytwarzanych przez grzyby pleśniowe w organizmie zwierząt powoduje wiele zaburzeń rozwojowych, anomalii chromosomalnych mogących rzutować na zdrowie i życie człowieka, dlatego tak ważne jest stałe kontrolowanie surowców i produktów żywnościowych na ich obecność oraz wdrażanie systemów zapobiegania rozwojowi patogenów toksynotwórczych [22].

Pleśnie wprowadzone do organizmu człowieka drogą pokarmową mogą powodować dwa typy chorób: choroby grzybicze (mikozy), w których następuje opanowanie żywej tkanki przez pleśnie oraz zatrucia (tzw. mikotoksykozy) wywołane spożyciem żywności zawierającej toksyczne metabolity grzybów [15]. Zatrucia mykotoksynami mogą być ostre – spowodowane jednorazowym spożyciem dużej dawki toksyny, lub przewlekłe, chroniczne – powstające w wyniku przyjmowania małych dawek, ale przez dłuższy czas [9].

Mykotoksyny wykazują wielokierunkowe działanie na organizm człowieka i zwierząt, powodują uszkodzenie wątroby, nerek, zakłócają funkcje przewodu pokarmowego i układu immunologicznego. Mogą wykazywać właściwości kancerogenne, mutagenne, cytotoksyczne, teratogenne, neurotoksyczne, dermatoksyczne czy estrogenne. Działanie toksyczne może prowadzić do ostrych i przewlekłych chorób zarówno u ludzi, jak i zwierząt; obejmuje następujące rodzaje toksyczności: immunotoksyczność, hepatotoksyczność, nefrotoksyczność, rakotwórczość i genotoksyczność [9, 23-26]. W tabeli 1 przedstawiono wykaz najważniejszych grzybów toksynotwórczych wraz z podaniem wytwarzanych przez nie mykotoksyn, miejsca akumulacji i ich wpływu na organizm.



Rysunek 1. Schemat dróg wnikania mykotoksyn do organizmu człowieka (opracowanie własne)

Tabela 1. Występowanie niektórych mykotoksyn w żywności i ich toksyczność

Grzyb toksynotwórczy	Wytwarzana mykotoksyna	Działanie toksyny	Potencjalne źródło obecności mykotoksyn
<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i>	aflatoksyny (AF): B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub> , oraz M <sub>1</sub> , M <sub>2</sub> , B <sub>1a</sub> i G <sub>2a</sub>	krwawienia, hepatotoksyczne, nefrotoksyczne, teratogenne, mutagenne, immunotoksyczne	orzeszki arachidowe, piwo, słód, kakao, rodzynki, kukurydza, pszenica, ryż, przyprawy, suszone owoce; mleko i produkty mleczne
<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>A. alianus</i> , <i>A. melleus</i> , <i>A. sulphureus</i> , <i>A. alutaceus</i> , <i>A. melleus</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. ostianus</i> , <i>Penicillium verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i> , <i>P. verrucosum</i> var. <i>verrucosum</i> , <i>P. commune</i> , <i>P. nordicum</i> , <i>P. purpurescens</i> , <i>P. variabile</i> <i>P. viridicatum</i>	ochratoksyna A (OTA)	hepatotoksyczne, nefrotoksyczne, teratogenne, mutagenne, immunotoksyczne	zboża, przetwory zbożowe, nasiona roślin strączkowych, przyprawy, orzechy, kawa, cytrusy, wino, żywność pochodzenia zwierzęcego

<p><i>Fusarium graminearum</i>, <i>F. culmorum</i>, <i>F. sporotrichioides</i>, <i>F. poae</i>, <i>F. equiseti</i>, <i>Trichoderma</i> spp., <i>Trichotheceum</i> spp., <i>Myrothecium</i> spp., <i>Stachybotrys</i> spp., <i>Cephalosporium</i> spp.</p>	<p>trichoteceny: deoksynivalenol (DON), niwalenol (NIV), toksyna T-2 (T-2), toksyna HT-2 (HT-2); rorydyny</p>	<p>utrata łąknienia, krwawe wymioty i biegunki, owrzodzenia jamy ustnej, hipotermia, dermatotoksyczne, toksyczna leukemia, immunotoksyczne</p>	<p>zboża, pasze</p>
<p><i>Fusarium graminearum</i>, <i>F. culmorum</i>, <i>F. cerealis</i>, <i>F. equiseti</i></p>	<p>zearalenon (ZON) i jego pochodne</p>	<p>pseudoestrogen, zaburzenia płodności, powoduje nowotwory</p>	<p>zboża, kukurydza</p>
<p><i>Fusarium culmorum</i>, <i>F. equiseti</i>, <i>F. graminearum</i>, <i>F. monilioforme</i>, <i>F. poae</i>, <i>F. sambucinum</i>, <i>F. sporotrichioides</i>, <i>F. verticilloides</i></p>	<p>fumonizyny (FUM)</p>	<p>obrzęki płuc, nowotwory wątroby, uszkodzenia mózgu, bezwład ruchowy</p>	<p>Zboża, kukurydza, oleje</p>
<p><i>Fusarium verticillioides</i>, <i>F. proliferatum</i>, <i>F. subglutinans</i>, <i>F. oxysporum</i>, <i>F. poae</i>, <i>F. avenaceum</i></p>	<p>eniantyna (EN), bowerycyna (BEA)</p>	<p>cytotoksyczne</p>	<p>zboża, wielozbożowa żywność dla dzieci</p>
<p><i>Penicillium expansum</i>, <i>P. patulum</i>, <i>P. cyclopium</i> <i>Aspergillus clavatus</i>, <i>A. giganteus</i> <i>A. chevalieri</i>, <i>A. terreus</i>, <i>Byssoschlamys fulva</i>, <i>B. nivea</i></p>	<p>patulina (PAT)</p>	<p>toksyna komórkowa, hepatotoksyczne, mutagenne, teratogenne, krwotoczne</p>	<p>owoce (głównie jabłka i cytrusy) i soki owocowe, sód</p>
<p><i>Aspergillus candidus</i>, <i>Penicillium viridicatum</i>, <i>Penicillium citrinum</i></p>	<p>cytrynina</p>	<p>nefrotoksyczne, krwotoczne</p>	<p>ryż, ziarna zbóż, pasze</p>
<p><i>Penicillium cyclopium</i>, <i>Aspergillus ochraceus</i></p>	<p>kwasy penicylinowe</p>	<p>hepatotoksyczne, nefrotoksyczne</p>	<p>powszechne, głównie zboża oraz kukurydza, salami, sery, fasola</p>
<p><i>Aspergillus falvus</i>, <i>A. parasiticus</i>, <i>A. versicolor</i>, <i>A. nidulans</i>, <i>A. regulosus</i></p>	<p>sterygmatozystyna</p>	<p>hepatotoksyczne, mutagenne</p>	<p>zboża, przetwory zbożowe, pasze, orzechy ziemne</p>

<i>Penicillium islandicum</i>	luteoskiryna, islandotoksyna	hepatotoksyczne, mutagenne	ryż
<i>Alternaria alternata</i> , <i>A. tenuissima</i>	kwas tenuazonowy, alternariole	mutagenne	owoce, warzywa, zboża
<i>Fusarium moniliforme</i>	moniliformina	kardiotoksyczne	zboża

Źródło: Opracowano na podstawie: Gertig [1]; Juan i in. [5]; Piotrowska [9]; Weidenbömer [14]; Dobosz i in. [23]; Brugger i in. [26]; Chełkowski [18]; Czembor [27]

### 3.1. Aflatoksyny

Najlepiej poznaną grupą mykotoksyn są aflatoksyny (AF). Obecnie ponad 5000 publikacji naukowych traktuje o tych związkach. Stwarzają największe zagrożenie w krajach klimatu subtropikalnego i tropikalnego. Znajdują się na orzeszkach arachidowych, makuchach bawełnianych oraz w ziarnie kukurydzy [10]. Wytwarzane przez różne gatunki grzybów z rodzaju *Aspergillus*, które są bardzo rozpowszechnione w środowisku naturalnym (w glebie), magazynach i w przechowywanych płodach rolnych. *A. flavus* wytwarza aflatoksynę B1 i B2, natomiast *A. parasiticus* aflatoksyny B1 i B2 oraz G1 i G2 [28]. Toksyny te posiadają liczne różnice strukturalne i sposoby oddziaływania na organizm docelowy [29]. W surowcach roślinnych najczęściej występuje aflatoksyna B1, najbardziej toksyczny metabolit z grupy aflatoksyn. O jej toksyczności decyduje obecność pierścienia laktonowego (tworzącego z sąsiadującym pierścieniem benzenowym taki sam układ jak w kumarynie) oraz dwóch pierścieni furanowych. Redukcja wiązania podwójnego w pierścieniu furanowym znacznie zmniejsza toksyczność związku. Aflatoksyna G1 różni się od B1 tym, że skrajny pierścień z ugrupowaniem ketonowym jest większy o atom tlenu, a po redukcji pierścienia furanowego tworzy się z niej pochodna – aflatoksyna G2 [18]. Aflatoksyny M1 i M2 są hydroksylowymi pochodnymi aflatoksyn B1 i B2, wydzielanymi z mlekiem krów po ich transformacji przez drobnoustroje zawarte w żwaczu krów [30]. Aflatoksyny posiadają najsilniejsze właściwości cytotoksyczne, mutagenne i kancerogenne względem człowieka i zwierząt. Wykrywano je przede wszystkim w orzeszkach arachidowych, kukurydzy, piwie, słodzie, kakao, rodzynekach, pszenicy, ryżu, przyprawach, suszonych owocach, ale także w mleku i produktach mlecznych, odżywkach dla dzieci, w świeżej wołowinie, szynce, bekonie, jajach i kielbasach dojrzewających. W tabeli 2 zestawiono przykłady występowania aflatoksyn w surowcach i żywności pochodzenia roślinnego oraz zwierzęcego w wybranych krajach – na bazie dostępnej literatury.

Tabela 2. Występowanie aflatoksyn w różnych rodzajach żywności

Kraj	Rodzaj żywności	Aflatok -syna	Ilość przebadanych próbek	Ilość próbek pozytywnych	Zawartość mykotoksyn (µg/kg)
Wietnam	ryż	B1	81	55	2,4-3,02
	pszenica		27	0	0-2
	płatki		27	27	3,2
	fasola		108	81	2,61-3,11
	mięso		297	267	3,99-4,17
	jaja		108	108	5,33
	warzywa		27	27	2,47

Brazylia	mleko pełne	M1	26	19	0,06-3,67
	mleko półpełne		12	9	0,09-1,4
	mleko odtłuszczone		11	7	0,04-1,05
	mleko dla niemowląt		10	6	0,88-2,8
Malezja	mleko	M1	12	4	0,007-0,012
	mleko w proszku		11	3	0,003-0,086
	mleko fermentowane		7	4	0,003-0,1
	jogurt		5	2	0,007-0,025
	sery		2	2	0,005-0,022
Nigeria	mleko krowie	M1	210	35	0,15-0,17
Brazylia	mleko	M1	95	52	0,009-0,437
	mleko UHT		244	169	0,008-4,1
	mleko w proszku		12	12	0,02-0,76
Pakistan	mięso drobiowe	ogółem	115	40	0,05-8,01
	jaja		80	22	0,05-4,46

Źródło: Opracowano na podstawie: Adegbeye i in. [31]; Becker-Alegri i in. [32]; Huang i in. [33]; Goncalves i in. [34]; Iqbal i in. [35]; Nadira i in. [36]

### 3.2. Ochratoksyny

Ochratoksyny (OT) wytwarzane są przez *Penicillium verrucosum* oraz *Aspergillus chraceus*, *A. sulphureus*, *A. sclerotium* i *A. mellus* we wszystkich strefach klimatycznych, a zwłaszcza chłodnych i wilgotnych, w trakcie niewłaściwego przechowywania ziarna zbóż [37]. Najbardziej poznana i opisana oraz wykazująca się największą toksycznością jest ochratoksyna A (OTA), którą skażone mogą być wszystkie zboża, z najbardziej podatnym żytem i pszenicą. Dużej zawartości ochratoksyny A w ziarnie sprzyja zanieczyszczenie glebą, nasionami chwastów oraz uszkodzenia mechaniczne powstałe podczas zbioru i obróbki ziarna. Ochratoksyna A jest też najczęściej oznaczaną mykotoksyną w Polsce. Wykazano, że 12% zbóż i 2% pasz jest zanieczyszczonych tą toksyną [38].

Ochratoksyna A jest peptydem aminokwasu L-fenylalaniny połączonym wiązaniem peptydowym poprzez grupę aminową z kwasem izokumarynowym. Wolna grupa karboksylowa nadaje ochratoksynom A i B kwasowy charakter. W cząsteczce ochratoksyny A występuje atom chloru podstawiony w pierścieniu benzenowym. O toksyczności tego związku decyduje też obecność grupy fenolowej. Związek nie zawierający chloru jest nazywany ochratoksyną B i jego toksyczność jest znacznie mniejsza [39]. Toksyczność ochratoksyny A ma ogromne znaczenie z punktu widzenia zagrożeń dla zdrowia ludzi i strat w produkcji zwierzęcej. Ochratoksyna jest typową nefrotoksyną, powodującą uszkodzenia nerek, a także wątroby. Może być przyczyną uszkodzenia płodów, powstawania nowotworów oraz upośledzania odporności organizmu [10]. Wybrane przykłady występowania ochratoksyny A w różnych krajach przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Występowanie ochratoksyny A w różnych rodzajach żywności

Kraj	Rodzaj żywności	Ilość przebadanych próbek	Ilość próbek pozytywnych	Zawartość mykotoksyny ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
Wietnam	ryż	81	0	0-1,9
	pszenica	27	0	0-1,9
	płatki	27	0	0-1,9
	fasola	108	54	9,21-10,16
	mięso	297	190	2,34-3,03
	jaja	108	81	0,29-3,4
	warzywa	27	0	0-1,9
Hiszpania	ryby	53	2	0,27
	mięso	22	4	8,09
Chiny	płatki	100	21	0-7,22
	fasola	100	14	0,003-0,086
Pakistan	mięso drobiowe	115	47	0,06-4,7
	jaja	80	28	0,06-2,98

Źródło: Opracowano na podstawie: Huang i in. [33]; Iqbal i in. [35]; Carballo i in. [40]; Zheng i in. [41]

### 3.3. Trichoteceny

Trichoteceny (TR) są metabolitami grzybów z rodzaju *Fusarium*. Są związkami o charakterze epoksydów seskwiterpenowych, gdyż zawierają szkielet 12, 13-epoksy- $\Delta$  9-trichotecenowy z podwójnym wiązaniem między 9 i 10 węglem, a różnią się podstawnikami (R1-R5) w szkielecie podstawowym. Trichoteceny obejmują ponad 140 różnych substancji, które podzielono na 4 grupy: A, B, C i D. Głównymi przedstawicielami grupy A są silne toksyny T-2 i HT-2, które wywołują zapalenia skóry, a także diacetoksyscirpenol (DAS), neosolaniol i inne pochodne. Grupę B trichotecenów reprezentują deoksyniwalenol (DON, womitoksyna) i jego acetylopo pochodne (posiadające silne działanie wymiotne), niwalenol (NIV) oraz fuzarenon czy diacetyloniwalenol [18]. Trichoteceny C i D to grupa toksyn wielocyklicznych, które w doświadczeniach na kulturach komórek okazały się dziesięciokrotnie silniejsze niż trichoteceny z grupy A. Zalicza się do tej grupy werukaryny, rorydyny i satratoksyny z odpowiednimi oznaczeniami literowymi. Najważniejszymi są: rorydyna A, werukaryna J oraz satratoksyna G i H [42]. Do grupy D zaliczane są trichoteceny dwuepoksydowe, np. krotecyna. Pod względem toksykologicznym największą rolę odgrywa deoksyniwalenol (DON), ponieważ może być on wytwarzany na polu, w dodatku równocześnie z zearalenonem. Występuje on najczęściej w kukurydzy, pszenicy i innych zbożach w klimacie umiarkowanym i subtropikalnym na wszystkich kontynentach [18]. Najsilniejszymi toksynami wśród trichotecenów są jednak T-2 toksyna i diacetoksyscirpenol (DAS). Oba te związki występują rzadziej niż DON i są typowe dla krajów o chłodnym klimacie. Cytotoksyczność trichotecenów została przypisana ich silnemu hamowaniu syntezy białek, RNA i DNA [43]. Inne skutki toksyczności to zakłócenie funkcjonowania błony komórkowej, tłumienie odpowiedzi immunologicznej i zaburzenia czynności krwi [44]. Poniżej w tabeli 4 przedstawiono wybrane przykłady występowania trichotecenów grupy B w surowcach i produktach żywnościowych.

Tabela 4. Występowanie deoksyniwalenolu (DON) i jego pochodnych: 3-acetylo-deoksyniwalenolu (3-ADON) i 15-acetylo-deoksyniwalenolu (15-ADON) w różnych rodzajach żywności

Kraj	Rodzaj żywności	Ilość przebadanych próbek	Ilość próbek pozytywnych	Zawartość mykotoksyny ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
Tunezja	jęczmień	31	7 (DON) 0 (3-ADON) 2 (15-ADON)	1,7-6,1 0 7,3-7,4
	zupy jęczmienne	38	6 (DON) 0 (3-ADON) 4 (15-ADON)	1,6-5,6 0 7,3-7,7
Hiszpania	płatki	88	55 (DON) 3 (3-ADON) 13 (15-ADON)	3,39 0,08 0,21
	legumina	24	5 (DON) 0 (3-ADON) 2 (15-ADON)	1,75 0 1,15
	warzywa	141	19 (DON) 0 (3-ADON) 10 (15-ADON)	1,53 0 0,27
	ryby	53	10 (DON) 5 (3-ADON) 5 (15-ADON)	1,19 0,15 0,35
	mięso	22	4 (DON) 0 (3-ADON) 0 (15-ADON)	1,64 0 0
Chiny	kukurydza	50	50 (DON) 50 (3-ADON) 50 (15-ADON)	0,5-584 0,7-8,4 0,5-242
	pszenica	38	38 (DON) 38 (3-ADON) 38 (15-ADON)	0,5-584 0,7-8,4 0,5-242

Źródło: Opracowano na podstawie: Juan i in. [5]; Carballo i in. [40]; Han i in. [45]

### 3.4. Zearalenon

Zearalenon (ZEA), początkowo nazywany F-2 toksyną, jest metabolitem *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis* i *F. equiseti* [46, 47] wykazującym aktywność hormonalną estrogeniczną. Pod względem chemicznym zearalenon jest  $\beta$ -rezorcynolaktonem. Obok pierścienia rezorcynowego zawiera makrocykliczny pierścień laktonowy, którego układ przestrzenny jest podobny do układu hormonów sterydowych. Stąd zearalenon jest klasyfikowany jako niesteroidowy mikoestrogen. Po przedostaniu się do krwiobiegu powoduje zmiany w układzie rozrodczym, podobnie jak naturalnie występujące estrogeny, ale jego działanie jest kilka razy silniejsze niż naturalnie występujących estrogenów [48-50]. Porażenie zbóż pleśniami grzybów z rodzaju *Fusarium* może wiązać się z obecnością w ziarnie zearalenonu, a także mikotoksyn trichotecenowych [51, 52]. Grzyby te powodują corocznie znaczące straty w rolnictwie. Są bowiem patogenami roślin zbożowych i motylkowych, zarówno siewek, jak i roślin dojrzewa-



jących. Wywołują zgorzel przedwschodową i powschodową siewek, zgorzel podstawy źdźbła i łodyg, fuzariozę kłosów i fuzariozę kolb [53]. Najczęściej jego obecność stwierdza się w ziarnie kukurydzy, pszenicy i jęczmienia.

### **3.5. Fumonizyny**

Jak dotąd poznano 15 analogów fumonizyn, które charakteryzuje podobna struktura chemiczna. Występują one przede wszystkim w ziarnie kukurydzy i jego produktach. Znaczenie ma zwłaszcza fumonizyna B1, nieco mniejsze fumonizyna B2 i fumonizyna B3. Mykotoksyny te odznaczają się właściwościami kancerogennymi ze względu na zawartą w swej budowie długołańcuchową jednostkę węglowodorową, podobną do sfingozyny i sfinganiny [54]. Fumonizyny zalicza się również do neurotoksyn, ponieważ uszkadzają szlak biosyntezy sfingozyny – ogólnie grupy sfingolipidów jako składnika tkanek mózgu i tkanki nerwowej. Powodują także uszkodzenie funkcji nerek. Grzyby tworzące fumonizyny należą przede wszystkim do gatunków *Fusarium verticillioides* oraz *F. proliferatum*, tworzących w największych ilościach fumonizynę B1, w mniejszych fumonizynę B2 i B3. Oprócz fumonizyn pleśnie gatunku *F. proliferatum* mogą tworzyć inne silnie toksyczne metabolity: bowerycyne, moniliforminę i fuzaproliferynę [55, 56].

### **3.6. Patulina**

Grzyby tworzące patulinę występują na wszystkich surowcach i produktach spożywczych, najczęściej jednak na owocach i przetworach owocowych, ale również na warzywach, ziarnie zbóż, mięsie, serach czy pieczywie. Syntetyzują ją grzyby należące do rodzajów *Penicillium* i *Aspergillus*, jednak największe znaczenie ma *P. expansum*. Wytwarzana przez nie toksyna często spotykana jest w psujących się jabłkach, gruszkach, winogronach, sokach z tych owoców i winach oraz np. pomidorach. Bardzo wysoki procent szczepów tego gatunku wykazuje zdolność do tworzenia dużych ilości patuliny, a także cytryniny. Grzyby te są saprofitami rozwijającymi się w warunkach wysokiej wilgotności względnej rzędu 80–90%. Patulina ma silne działanie toksyczne, a także teratogenne i kancerogenne. Pod względem chemicznym patulina jest dwupierścieniowym laktone, a także wykazuje bardzo dużą reaktywność, łatwo wchodząc w połączenia z białkami i kwasami nukleinowymi [18].

## **4. Metody oznaczania mykotoksyn**

Aby określić występowanie i ilość mykotoksyn w różnych rodzajach żywności stosuje się różne metody analityczne. Szczególną uwagę poświęca się doborowi precyzyjnych, niezawodnych i powtarzalnych metod do ich wykrywania w żywności i paszach. Pobieranie próbek i ich analiza ma kluczowe znaczenie ze względu na wysoką toksyczność tych związków już w bardzo niskich stężeniach. Badania dotyczące wykrywania oraz charakterystyki jakościowej i oceny ilościowej mykotoksyn w poszczególnych produktach żywnościowych są nadal aktualnym tematem wielu prac naukowych [57-59]. W chwili obecnej najbardziej klasyczne i powszechnie stosowane metody oznaczania jakościowego i ilościowego mykotoksyn można podzielić na dwie grupy – wykorzystujące dwa rodzaje technik:

- techniki chromatograficzne, jak chromatografia cienkowarstwowa (TLC) [60], wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) [61], chromatografia gazowa (GC) [62], chromatografia cieczowa z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS) [63, 64];

- techniki immunoenzymatyczne, jak immunoenzymatyczny test (ELISA) [65] czy immunoenzymatyczny test przepływu lateralnego (LFA) [66].

Chromatografia cienkowarstwowa (TLC) jest techniką prostą do wykonania, nie wymagającą posiadania kosztownego sprzętu i przy wprawie daje możliwość wnioskowania odnośnie do składu jakościowego mieszaniny mykotoksyn. Technika polega na rozdzielaniu mieszaniny mykotoksyn na płytce pokrytej żelom silikonowym przez zastosowanie mieszaniny odpowiednio dobranych rozpuszczalników. Po wysuszeniu chromatogramu, obserwuje się fluorescencję poszczególnych plam w świetle ultrafioletowym. Porównując intensywność fluorescencji oraz wartość współczynników rozdzielania  $R_f$  z naniesionymi wzorcami, można określić stężenie badanej mykotoksyny w próbce. Ma jednak słabą skuteczność separacji, a także niską czułość i dokładność w przypadku mykotoksyn niefluoryzujących. Obecnie wykorzystywana głównie do potwierdzania niezgodności z regulacjami prawnymi dotyczącymi jednego lub kilku pokrewnych związków należących do tej samej klasy mykotoksyn. Czasami służą jako metoda referencyjna do walidacji testów immunochemicznych [7].

Pozostałe techniki chromatograficzne, jak wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC), chromatografię gazową (GC) czy chromatografię cieczową sprzężoną ze spektrometrią mas (LC-MS/MS), pozwalają na oznaczanie wszystkich grup mykotoksyn z dużo lepszym rozdzielaniem toksyn, lepszą wykrywalnością i specyficznością oraz dużo większą przepustowością niż w chromatografii cienkowarstwowej. Posiadając te niezaprzeczalne zalety, wymagają bardzo drogiej aparatury badawczej, dużej biegłości osób obsługujących tę aparaturę oraz skomplikowanych procedur przygotowania próbek do badań. Ogólnie rzecz ujmując, są to techniki fizykochemiczne, polegające na separacji mieszaniny w kolumnach wypełnionych sorbentem, do której dochodzi na skutek oddziaływań międzycząsteczkowych pomiędzy rozdzielaną mieszaniną związków chemicznych a wypełnieniem kolumny. Rozdział jest możliwy tylko wtedy, gdy składniki próbki znajdują się w fazie ruchomej, którą w chromatografii cieczowej jest oczywiście ciecz, a w gazowej – gaz. Po rozdzielaniu składników próbki w kolumnie analitycznej na jej wyjściu są wykrywane i mierzone przez detektor [67]. Pokrzywa i in. [68] wykorzystali technikę HPLC do oznaczania patuliny w próbkach soku jabłkowego. Zidentyfikowali jej występowanie w dwóch z 50 przebadanych próbek, ale w ilościach nieprzekraczających najwyższych dopuszczalnych poziomów (NDP). Oueslati i in. [69] wykorzystali natomiast techniki chromatografii cieczowej i gazowej sprzężone z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS i GC-MS/MS) do oznaczania 20 różnych mykotoksyn w próbkach zbóż i produktów zbożowych przeznaczonych dla niemowląt. Badania autorów wykazały, że 67% próbek zawierało co najmniej jedną mykotoksykozę. Najczęściej wykazywano obecność deoksynivalenolu (38% próbek), który osiągnął maksymalną zawartość na poziomie 240 mg/g produktu z jęczmienia. Wykazali także, że w 32% próbek występowało jednocześnie od 2 do 6 różnych mykotoksyn.

Drugą grupę metod stanowią metody immunoenzymatyczne, które wykorzystują specyficzną reakcję między antygenem, jakim jest mykotoksyna, a specyficznym dla niej przeciwciałem. Są one stale rozwijane, ponieważ ze względu na łatwość wykonania i posiadanie formy komercyjnych zestawów odczynników, umożliwiającą wykonanie badania w terenie, nadają się idealnie do pierwszego poziomu badań wykrywających obecność mykotoksyn w łańcuchu pokarmowym [7]. Najczęściej stosowana jest technika immunoenzymatyczna ELISA. W technice tej stosuje się wielokomorowe

plytki polistyrenowe opłaszczane przeciwciałami swoistymi dla poszukiwanej toksyny. Analiza polega na jednoczesnym dodaniu badanej próbki oraz toksyny znakowanej enzymem (koniugat enzymowy), między którymi następuje współzawodnictwo o przyłączenie do przeciwciała. W pierwszej kolejności następuje wiązanie do przeciwciała wolnej toksyny, a następnie koniugatu enzymowego, którego nadmiar zostaje odmyty. Następnie dodawane są: substrat oraz związek chromogeny. Ilość barwnego produktu reakcji enzymatycznej określa się metodą spektrofotometryczną przy długości fali 450 nm. Absorbancja jest odwrotnie proporcjonalna do zawartości mykotoksyny w próbce. Konieczne jest porównanie uzyskanych wyników z wzorcami lub odczyt z krzywej standardowej. Czas wykonania analizy testem ELISA wynosi około 3 godziny. Stosuje się też szybkie testy progowe, pozwalające na wykrycie obecności toksyn w krótkim czasie (10-15 min.), stosowane do badań skriningowych. Taką techniką jest m.in. immunoenzymatyczny test przepływu lateralnego (LFA). Zyskał on szerokie zastosowanie w szybkiej diagnostyce klinicznej, badaniach bezpieczeństwa żywności, monitorowania środowiska naturalnego i upraw rolniczych ze względu na wyjątkowe zalety, jak łatwość obserwacji wyników, przyjazny dla użytkownika format, łatwe przechowywanie i wygodny transport. Technologia testu LFA oparta jest, podobnie jak testu ELISA, na specyficznej reakcji antygen-przeciwciała. Wynik, który odczytuje się gołym okiem, pojawia się w postaci linii na pasku testowym. W ostatnim dziesięcioleciu LFA był stosowany do szybkiego wykrywania wielu mykotoksyn: aflatoksyny B1 i B2 [70], ochratoksyny A [71], deoksyniwalenolu [72, 73], fumonizyn B1, B2 i B3 [74], zearealenonu [75, 76] oraz toksyn T-2 i HT-2 [77]. Natomiast testem ELISA Pokrzywa i in. [68] wykrywali zawartość sumy aflatoksyn B1, B2, G1 i G2 oraz ochratoksyny A w różnych rodzajach produktów spożywczych. Autorzy wykazali, że aflatoksyny występowały wśród 91 przebadanych próbek, 21 próbek ziół i przypraw oraz 8 próbek rodzynek zawierało aflatoksyny, a w przypadku ochratoksyny A – jej obecność wykazano w 42 ze 107 badanych próbek. Jednak nie przekraczały one określonych limitów.

## **5. Regulacje prawne – aspekt legislacyjny**

Opracowanie regulacji dotyczących dopuszczalnych poziomów mykotoksyn w żywności i paszach było przedmiotem prac wielu organizacji międzynarodowych oraz regionalnych, jak np. WHO (*World Health Organization*), FAO (*Food Agriculture Organization*), EFSA (*European Food Safety Authority*), Codex Alimentarius, JECFA (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*), GSO (*GCC Standardization Organization*) i wielu innych [57, 78]. Rezultatem tych prac było opracowanie dopuszczalnych limitów zawartości mykotoksyn w żywności i paszach, które są bezpieczne dla zdrowia konsumentów – w szerokiej gamie produktów spożywczych określonych przez UE w rozporządzeniach Komisji (WE) nr 1881/2006 oraz zaleceniach Komisji 2006/576/WE, 2006/583/WE [79-81]. W tabeli 5 podano maksymalne dopuszczalne poziomy zanieczyszczenia środków spożywczych mykotoksynami zaczerpnięte z rozporządzenia Komisji (WE) nr 1881/2006.

Tabela 5. Najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych mykotoksyn w środkach spożywczych (rozporządzenie Komisji (WE) nr 1881/2006)

Lp.	Środek spożywczy	Najwyższe dopuszczalne poziomy ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		
		B <sub>1</sub>	Suma B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> i G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>
<b>AFLATOKSYNY</b>				
1	Orzechy arachidowe (orzeszki ziemne), orzechy laskowe, orzechy brazylijskie i inne nasiona oleiste, które mają być sortowane lub poddane innej fizycznej obróbce przed spożyciem przez ludzi lub użyciem jako składnik w środkach spożywczych, z wyjątkiem: orzechów arachidowych i innych nasion oleistych przeznaczonych do tłoczenia oleju w celu produkcji rafinowanego oleju roślinnego	8,0	15,0	-
2	Migdały, pistacje i pestki moreli, które mają być sortowane lub poddane innej fizycznej obróbce przed spożyciem przez ludzi lub użyciem jako składnik w środkach spożywczych	12,0	15,0	-
3	Orzechy arachidowe (orzeszki ziemne) i inne nasiona oleiste oraz produkty z nich przetworzone, przeznaczone do bezpośredniego spożycia przez ludzi lub użycia jako składniki w środkach spożywczych, z wyjątkiem: surowego oleju roślinnego przeznaczonego do rafinacji, rafinowanego oleju roślinnego	2,0	4,0	-
4	Suszone owoce, które mają być sortowane lub poddane innej fizycznej obróbce przed spożyciem przez ludzi lub użyciem jako składnik w środkach spożywczych	5,0	10,0	-
5	Suszone owoce oraz produkty z nich przetworzone, przeznaczone do bezpośredniego spożycia przez ludzi lub użycia jako składniki w środkach spożywczych	2,0	4,0	-
6	Wszystkie zboża i wszystkie ich produkty pochodne, w tym przetworzone produkty zbożowe, z wyjątkiem środków spożywczych wymienionych w pkt 7, 10, 12	2,0	4,0	-
7	Kukurydza i ryż, które mają być sortowane lub poddane innej fizycznej obróbce przed spożyciem przez ludzi lub użyciem jako składnik w środkach spożywczych	5,0	10,0	-
8	Surowe mleko, mleko poddane obróbce cieplnej i mleko służące do wytwarzania produktów na bazie mleka	-	-	0,05
9	Przyprawy: <i>Capsicum</i> spp. (pochodzące z tego gatunku suszone owoce, całe lub mielone, w tym papryka chili, mielone chili, pieprz kajeński i papryka); <i>Piper</i> spp. (pochodzące z niego owoce, w tym biały i czarny pieprz); <i>Myristica fragrans</i> (gałka muszkatowa); <i>Zingiber officinale</i> (imbir); <i>Curcuma longa</i> (kurkuma); mieszanki przypraw zawierające jedną lub więcej wyżej wspomnianych przypraw	5,0	10,0	-
10	Przetworzona żywność na bazie zbóż oraz żywność dla niemowląt i małych dzieci	0,10	-	-
11	Preparaty do początkowego żywienia niemowląt i preparaty do dalszego żywienia niemowląt, w tym mleko początkowe i mleko następne	-	-	0,025
12	Dietetyczna żywność specjalnego przeznaczenia medycznego przeznaczona specjalnie dla niemowląt	0,10	-	0,025

<b>OCHRATOKSYNA A</b>		<b>Najwyższe dopuszczalne poziomy (µg/kg)</b>
13	Nieprzetworzone zboża	5,0
14	Wszystkie produkty pochodzące z nieprzetworzonych zbóż, w tym produkty z przetworzonych zbóż oraz zboża przeznaczone do bezpośredniego spożycia przez ludzi, z wyjątkiem środków spożywczych wymienionych w pkt 20 i 21	3,0
15	Suszone owoce winorośli (rodzynki koryntki i sułtanki)	10,0
16	Palone ziarna kawy i mielona kawa palona, z wyjątkiem kawy rozpuszczalnej	5,0
17	Kawa rozpuszczalna	10,0
18	Wino (w tym wino musujące, z wyjątkiem wina likierowego i wina o mocy alkoholu poniżej 15% obj.), wino owocowe; wino aromatyzowane, napoje na bazie wina aromatyzowanego i aromatyzowane koktajle winopochodne	2,0
19	Sok winogronowy, koncentrat soku winogronowego po rozcieńczeniu wodą, nektar winogronowy, moszcz winogronowy i koncentrat moszczu winogronowego po rozcieńczeniu wodą przeznaczony do bezpośredniego spożycia przez ludzi	2,0
20	Przetworzona żywność na bazie zbóż oraz żywność dla niemowląt i małych dzieci	0,5
21	Produkty dietetyczne do specjalnych celów medycznych, przeznaczone specjalnie dla niemowląt	0,5
22	Przyprawy: <i>Capsicum</i> spp. (pochodzące z tego suszone owoce, całe lub mielone, w tym papryka chili, mielone chili, pieprz kajeński i papryka); <i>Piper</i> spp. (pochodzące z niego owoce, w tym biały i czarny pieprz); <i>Myristica fragrans</i> (gałka muszkatołowa); <i>Zingiber officinale</i> (imbir); <i>Curcuma longa</i> (kurkuma); mieszanki przypraw zawierające jedną lub więcej wyżej wspomnianych przypraw	15,0
23	Korzeń lukrecji, składnik naparów ziołowych, wyciąg z lukrecji stosowany w żywności, w szczególności w napojach i słodczych	20,0 80,0
<b>PATULINA</b>		<b>Najwyższe dopuszczalne poziomy (µg/kg)</b>
24	Soki owocowe, koncentrat soków owocowych po rozcieńczeniu wodą, nektary owocowe, napoje spirytusowe, jablecznik i inne sfermentowane napoje otrzymywane z jabłek lub zawierające sok jabłkowy	50,0
25	Produkty z jabłek, w tym kompot jabłkowy, purée jabłkowe przeznaczone do bezpośredniego spożycia, z wyjątkiem środków spożywczych wymienionych w pkt 26 i 27	25,0
26	Sok jabłkowy i produkty z jabłek, w tym kompot jabłkowy i purée jabłkowe, dla niemowląt i małych dzieci, jako takie oznakowane i sprzedawane	10,0
27	Żywność dla niemowląt, inna niż przetworzona żywność na bazie zbóż dla niemowląt i małych dzieci	10,0

<b>DEOKSYNIWALENOL</b>		<b>Najwyższe dopuszczalne poziomy (µg/kg)</b>
28	Nieprzetworzone zboża inne niż pszenica durum, owies i kukurydza	1250
29	Pszenica durum i owies (nieprzetworzone), nieprzetworzona kukurydza, z wyjątkiem nieprzetworzonej kukurydzy przeznaczonej do mielenia na mokro	1750
30	Zboża przeznaczone do bezpośredniego spożycia przez ludzi, mąka zbożowa, otręby oraz zarodki jako produkt końcowy wprowadzany na rynek do bezpośredniego spożycia oraz makaron (suchy), z wyjątkiem środków spożywczych wymienionych w pkt 32, 33 i 34	750
31	Chleb (w tym małe produkty piekarnicze), ciasta, herbatniki, przekąski zbożowe i płatki śniadaniowe	500
32	Przetworzona żywność na bazie zbóż oraz żywność dla niemowląt i małych dzieci	200
33	Frakcje mielenia kukurydzy o rozmiarze cząsteczek powyżej 500 mikronów, objęte kodem CN 1103 13 lub 1103 20 40 oraz inne produkty mielenia kukurydzy o rozmiarze cząsteczek powyżej 500 mikronów nieprzeznaczone do bezpośredniego spożycia przez ludzi, objęte kodem 1904 10 10	750
34	Frakcje mielenia kukurydzy o rozmiarze cząsteczek do 500 mikronów (objęte kodem CN 1102 20) oraz inne produkty mielenia kukurydzy o rozmiarze cząsteczek do 500 mikronów nieprzeznaczone do bezpośredniego spożycia przez ludzi, objęte kodem CN 1904 10 10	1250
<b>ZEARALENON</b>		<b>Najwyższe dopuszczalne poziomy (µg/kg)</b>
35	Nieprzetworzone zboża inne niż kukurydza	100
36	Nieprzetworzona kukurydza, z wyjątkiem nieprzetworzonej kukurydzy przeznaczonej do mielenia na mokro	350
37	Zboża przeznaczone do bezpośredniego spożycia przez ludzi, mąka zbożowa, otręby oraz zarodki jako produkt końcowy wprowadzany na rynek do bezpośredniego spożycia, z wyjątkiem środków spożywczych wymienionych w pkt 40, 41, 42, 43 i 44	75
38	Olej kukurydziany rafinowany	400
39	Chleb (w tym małe produkty piekarnicze), ciasta, herbatniki, przekąski zbożowe i płatki śniadaniowe, z wyjątkiem przekąsek kukurydzianych i płatków śniadaniowych na bazie kukurydzy	50
40	Kukurydza przeznaczona do bezpośredniego spożycia przez ludzi, przekąski kukurydziane i płatki śniadaniowe na bazie kukurydzy	100
41	Przetworzona żywność na bazie zbóż (z wyjątkiem przetworzonej żywności na bazie kukurydzy) oraz żywność dla niemowląt i małych dzieci	20
42	Przetworzona żywność na bazie kukurydzy dla niemowląt i małych dzieci	20

43	Fracje mielenia kukurydzy o rozmiarze cząsteczek powyżej 500 mikronó (objęte kodem CN 1103 13 lub 1103 20 40), oraz inne produkty mielenia kukurydzy o rozmiarze cząsteczek powyżej 500 mikronów, nieprzeznaczone do bezpośredniego spożycia przez ludzi, objęte kodem CN 1904 10 10	200
44	Fracje mielenia kukurydzy o rozmiarze cząsteczek co do 500 mikronów (objęte kodem CN 1102 20) oraz inne produkty mielenia kukurydzy o rozmiarze cząsteczek do 500 mikronów, nieprzeznaczone do bezpośredniego spożycia przez ludzi, objęte kodem CN 1904 10 10	300
<b>FUMONIZYNY</b>		<b>Suma B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub> (mg/kg)</b>
45	Nieprzetworzona kukurydza, z wyjątkiem nieprzetworzonej kukurydzy przeznaczonej do mielenia na mokro	4000
46	Kukurydza przeznaczona do bezpośredniego spożycia przez ludzi, żywność na bazie kukurydzy przeznaczona do bezpośredniego spożycia przez ludzi, z wyjątkiem środków spożywczych wymienionych w pkt 47 i 48	1000
47	Płatki śniadaniowe na bazie kukurydzy i przekąski kukurydziane	800
48	Przetworzona żywność na bazie kukurydzy oraz żywność dla niemowląt i małych dzieci	200
49	Fracje mielenia kukurydzy o rozmiarze cząsteczek powyżej 500 mikronów (objęte kodem CN 1103 13 lub 1103 20 40), oraz inne produkty mielenia kukurydzy o rozmiarze cząsteczek powyżej 500 mikronów nieprzeznaczone do bezpośredniego spożycia przez ludzi, objęte kodem CN 1904 10 10	1400
	Fracje mielenia kukurydzy o rozmiarze cząsteczek do 500 mikronów, objęte kodem CN 1102 20, oraz inne produkty mielenia kukurydzy o rozmiarze cząsteczek do 500 mikronów nieprzeznaczone do bezpośredniego spożycia przez ludzi, objęte kodem CN 1904 10 10	2000

Procedury pobierania próbek do kontroli mykotoksyn w żywności i paszach przedstawiono w Codex Alimentarius i rozporządzeniu Komisji (WE) 401/2006 [82]. Według tych rozporządzeń i zaleceń – np. dopuszczalna maksymalna zawartość aflatoksyny B<sub>1</sub> w orzeszkach ziemnych, orzechach laskowych, orzechach brazylijskich i nasionach oleistych poddawanych obróbce fizycznej przed spożyciem przez ludzi wynosi 8 mg/kg; aflatoksyny M<sub>1</sub> w mleku wynosi 0,05 mg/kg; ochratoksyny A w kompletnych paszach dla trzody chlewnej wynosi 0,1 mg/kg, a dla patuliny w sokach owocowych 50 mg/kg.

## 6. Zapobieganie

Pozostałości mykotoksyn mogą dostawać się do produktów spożywczych drogą bezpośrednią lub pośrednią, jak choćby przez zanieczyszczone pasze, jak opisano wcześniej. Można temu zapobiegać lub w znacznym stopniu ograniczać. Bardzo skuteczną metodą jest monitoring jakości mikrobiologicznej oraz podejmowanie wszelkich możliwych działań zapobiegających rozwojowi grzybów mikroskopowych (tzw. polowych) już w trakcie wzrostu roślin przeznaczonych na surowce spożywcze i paszowe. Można to osiągnąć poprzez stosowanie odpowiednich technologii prowadzenia upraw, w tym stosowanie płodozmianu, dokładne przyorywanie resztek poźniwnych, zbilansowane nawożenie zbóż, staranne czyszczenie i zaprawianie materiału siewnego, odpowiedni

dobór odmian. Konieczne jest też stosowanie środków ochrony roślin. Od dawna stosowane są chemiczne fungicydy (np. triazole) i insektycydy. Obecnie można także stosować biologiczne środki grzybobójcze, np. preparaty zawierające zarodniki grzybów *Pythium oligandrum*, *Trichoderma harzianum*, które są pasożytami lub antagonistami niektórych gatunków grzybów patogennych, jak choćby *Fusarium* spp., natomiast biologiczne środki owadobójcze mogą zawierać bakterie (np. *Bacillus subtilis*, *B. thuringiensis*) czy wirusy entomopatogeniczne (np. wirus CpGV) [83]. Dalsze działania powinny obejmować przestrzeganie rygorystycznych zasad higienicznych podczas zbioru, przechowywania i przetwarzania płodów rolnych i pasz [84]. Właściwe suszenie i przechowywanie plonów to także skuteczne narzędzia do ograniczenia wzrostu pleśni (magazynowych) i produkcji mykotoksyn. Z kolei dekontaminacja pasz oraz żywności skażonej mykotoksynami obejmuje podejścia: fizyczne (sortowanie, mycie), chemiczne (zastosowanie fungicydów) i biologiczne (wprowadzenie atoksycznych szczepów *A. flavus* i *A. parasiticus*). Ciągły nadzór nad mykotoksynami w uprawach rolnych, paszach zwierzęcych i w żywności to długoterminowa strategia interwencyjna zalecana przez organizacje wprowadzające regulacje prawne [59]. W toku produkcji żywności stosowanymi sposobami mającymi zapewnić niskie poziomy mykotoksyn są: poprawne stosowanie dobrych praktyk higienicznych (GHP) oraz dobrych praktyk produkcyjnych (GMP), a także prawidłowy dobór parametrów technologicznych, takich jak np. aktywność wody, pH, zawartość soli, temperatura. Do obiecującej strategii dezaktywacji mykotoksyn, zwłaszcza w produktach fermentowanych, należy wiązanie ich przez szczepy bakterii fermentacji mlekowej o potencjale probiotycznym (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* i *Propionibacterium*) lub prebiotyki czy izotiocyaniany z nasion gorczycy [85, 86].

## 7. Wnioski

1. Ze względu na opisane powyżej aspekty zdrowotne i ekonomiczne – bezwzględnie konieczne jest minimalizowanie ryzyka narażenia upraw, płodów rolnych i produktów na zanieczyszczenie pleśniami mogącymi wytwarzać mykotoksyny. Najkorzystniejsze są działania prewencyjne polegające na odpowiednim traktowaniu surowca roślinnego podczas wegetacji, zbioru i magazynowania. Należą do nich m.in.: wybór odmian odpornych na infekcje grzybowe i szkodniki, minimalizowanie narażenia roślin na stres (np. zimno, susza), rozważne stosowanie środków ochrony roślin (chemicznych i biologicznych), stosowanie biologicznych środków zapobiegających rozwojowi grzybów, terminowe zbiory, minimalizowanie uszkodzeń mechanicznych i zanieczyszczenia glebą, płodozmian, prawidłowe magazynowanie surowców.
2. Postęp wiedzy i pojawianie się nowych narzędzi analitycznych ujawnia coraz to nowsze metabolity o charakterze mykotoksyn, a także poprawia czułość, dokładność i odtwarzalność metod już istniejących.
3. Dane analizowane w niniejszej monografii wskazują na konieczność ciągłego monitorowania obecności mykotoksyn we wszystkich rodzajach surowców i produktów żywnościowych oraz szybkiego reagowania służb nadzoru sanitarnego i legislacyjnego celem minimalizowania zagrożeń dla zdrowia konsumentów.



## Literatura

1. Gertig H, *Żywność a zdrowie*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1996.
2. Bennett J.W., Klich M., *Mycotoxins*. Encyclopedia of Microbiology, 3<sup>rd</sup> ed., 2009.
3. Barkai-Golan R., Paster N., *Mouldy fruits and vegetables as a source of mycotoxins: part 1*, World Mycotoxin Journal, 1, 2008, s. 147-159.
4. Filtenborg O., Frisvad J.C., Erane U., *Moulds in food spoilage*, International Journal of Food Microbiology, 22, 1996, s. 85-102.
5. Juan C., Berrada H., Mañes J., Oueslati S., *Multi-mycotoxin determination in barley and derived products from Tunisia and estimation of their dietary intake*, Food Chemistry and Toxicology, 103, 2017, s. 148-156.
6. Weidenbömer M., *Mycotoxins in plants and plant products*, Springer International Publishing AG, Niemcy, Bonn 2017.
7. Anfossi L., Giovannoli C., Baggiani C., *Mycotoxin detection*, Current Opinion in Biotechnology, 37, 2016, s. 120-126.
8. Kralj Cigić I., Prosen H., *An overview of conventional and emerging analytical methods for the determination of mycotoxins*, International Journal of Molecular Sciences, 10(1), 2009, s. 62-115.
9. Piotrowska M., *Wykorzystanie mikroorganizmów do usuwania mikotoksyn z żywności i pasz*, Postępy Mikrobiologii, 51(2), 2012, s. 109-119.
10. Wróbel B., *Zagrożenia zwierząt i ludzi toksynami grzybów pleśniowych zawartych w paszach i żywności*, Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie, 14(3), 2014, s. 159-176.
11. Franck H.K., *Einführung in die Mykotoxinforschung*, Angewandte Botanik, 64, 1990, s. 151-165.
12. Gedek B., *Kompendium der medizinischen Mykologie*, Verlag Parey, Berlin 1980.
13. Wojtaszczyk B., *Mikotoksyny - niewidzialny przeciwnik*, Farmer, 7, 2017.
14. Weidenbömer M., *Lebensmittel Mykologie*, Behr's GmbH, Hamburg 1999.
15. Wieczorek C., *Mikrobiologiczne skażenia żywności*, Żywność: Nauka – Technologia – Jakość, 3(36), 2003, s. 119-129.
16. Paterson R.R.M., Lima N., *How will climate change affect mycotoxins in food?* Food Research International, 43, 2010, s.1902-1914.
17. Hussein S.H., Brasel J.M., *Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals*, Toxicology, 167, 2001, s.101-134.
18. Chełkowski J. *Mikotoksyny, grzyby toksynotwórcze i mikotoksykozy*, 2010, <http://www.cropnet.pl/dbases/mycotoxins.pdf.pl/download> [dostęp: 3.10.2020].
19. Jankowska M., Łozowicka B., *Wpływ procesów technologicznych na poziomy stężenie naturalnych i syntetycznych substancji toksycznych występujących w roślinach rolniczych i ich produktach oraz metody oznaczania toksyn*, Progress in Plant Protection, 61(1), 2021, s. 40-52.
20. Cecchini F., Morassut M., Garcia Moruno E., Di Stefano R., *Influence of yeast strain on ochratoxin, a content during fermentation of white and red must*. Food Microbiology, 23(5), 2006, s. 411-417.
21. Garda J., Macedo R.M., Faria R., Bernd L., Dors G.C., Badiale-Furlong E., *Alcoholic fermentation effects on malt spiked with trichothecenes*, Food Control, 16(5), 2005, s. 423-428.
22. Ledzion E., Postupolski J., Rybiński K., Kurpińska-Jaworska J., Szczesna M., Karłowski K., *System RASFF jako element strategii bezpieczeństwa żywności w zakresie mikotoksyn*, Bromatologia, Chemia i Toksykologia, 43(4), 2010, s. 533-538.
23. Dobosz B., Król K., Lar K., Mroczek A., Zbrojkiewicz E., Złotkowska R., *Mycotoxins in food products – health effects and methods of monitoring in Poland (Mikotoksyny w żywności, skutki zdrowotne, metody monitorowania w Polsce)*, Medical Science Pulse, 11, 2017, s. 61-66.

24. Nicholson P., Magan N., Olsen M., *Rapid detection of mycotoxigenic fungi in plants*, [w:] *Mycotoxins in food: detection and control*. Elsevier Science, Burlington, UK 2004.
25. Ushkalov V., Danchuk V., Midyk S., Voloshchuk N., Danchuk O., *Mycotoxins in milk and in dairy products*, *Food Science and Technology*, 14, 2020, s. 137-150.
26. Brugger E.M., Wagner J., Schumacher D.M., Koch K., Podlech J., Metzler M., Lehmann L., *Mutagenicity of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells*, *Toxicology Letters*, 164(3), 2006, s. 221-230.
27. Czembor E., *Integrowany system ochrony roślin opracowany na przykładzie kukurydzy*, *Więś Jutra*, 3-4, 2011, s. 50-52.
28. D'Mello J.P.F., MacDonald A.M.C., *Mycotoxins*. *Animal. Feed Sciences and Technology*, 69, 1997, s. 155-166.
29. Eaton D.L., Groopman J.D., *The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance*, Academic Press, San Diego, USA 1994.
30. Goldblatt L.A., *Aflatoxin. Scientific background, control and implications*, Academic Press, New York 1969.
31. Adegbeye M.J., Reddy P.R.K., Chilaka C.A., Balogun O.B., Elghandour M.M.Y., Rivas-Caceres R.R., Salem A.Z.M., *Mycotoxin toxicity and residue in animal products. Prevalence, consumer exposure and reduction strategies. A review*, *Toxicon*, 177(15), 2020, s. 96-108.
32. Becker-Algeri T.A., Castagnaro D., de Bortoli K., de Souza C., Drunkler D.A., Badiale-Furlong E., *Mycotoxins in Bovine Milk and Dairy Products. A Review*, *Journal of Food Science*, 81(3), 2016, s. 544-552.
33. Huong B.T.M., Le D.T., Tuan D.H., Brimer L., Dalsgaard A., *Dietary exposure to aflatoxin B 1, ochratoxin A and fumonisins of adults in Lao Cai province, Viet Nam. A total dietary study approach*, *Food Chemistry and Toxicology*, 98(B), 2016, s. 127-133.
34. Goncalves K.D.M., Sibaja K.V.M., Feltrin A.C.P., Remedi R.D., Garcia S.D.O., Garda-Buffon J., *Occurrence of aflatoxins B1 and M1 in milk powder and UHT consumed in the city of Assomada (Cape Verde Islands) and southern Brazil*, *Food Control*, 93, 2018, s. 260-264.
35. Iqbal S.Z., Nisar S., Asi M.R., Jinap S., *Natural incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in chicken meat and eggs*, *Food Control*, 43(8), 2014, s. 98-103.
36. Nadira A.F., Rosita J., Norhaizan M.E., Redzwan S.M., *Screening of aflatoxin M 1 occurrence in selected milk and dairy products in Terengganu, Malaysia*, *Food Control*, 73, 2016, s. 209.
37. Karunaratne A., Wezenberg E., Bullerman L.B., *Inhibition of mold growth and aflatoxin production by Lactobacillus spp.*, *Journal of Food Protection*, 53, 1990, s. 230-236.
38. Czerwiecki L., *Ochratoxin A other mycotoxins in Polish cereals and foods*, *Mycotoxin Research*, 17(2), 2001, s. 125-128.
39. Steyn P.S., *Microbial toxins*, Academic Press, New York-London, USA 1971.
40. Carballo D., Molto J.C., Berrada H., Ferrer E., *Presence of mycotoxins in ready-to-eat food and subsequent risk assessment*, *Food Chemistry and Toxicology*, 121, 2018, s. 558-565.
41. Zheng H., Nie D., Yang X., Wang J., Peng S., Wu A., *Quantitative assessment of risk associated with dietary intake of mycotoxin ochratoxin A on the adult inhabitants in Shanghai city of P.R. China*. *Food Control*, 32(2), (2013), 490-495.
42. Ueno Y., *Trichotecenes. Chemical, biological and toxicological aspect*. Elsevier, Amsterdam, Kodansha LTD, Tokyo, Japonia, 1983.
43. Liao, L.L., Grollman, A.P., Horwitz, S.B., *Mechanism of action of the 12,13-epoxytrichothecene, anguidine, an inhibitor of protein synthesis*. *Biochimica and Biophysica Acta*, 454, (1976), 273-284.

44. Bunner, D.L., Morris, E.R., *Alteration of multiple cell membrane functions in L-6 myoblasts by T-2 toxin: an important mechanism of action*. Toxicology and Applied Pharmacology, 92, (1988), 113-121.
45. Han Z., Nie D., Ediage E.N., Yang X., Wang J., Chen B., Li S., On S.L.W., Saeger S.D., Wu A., *Cumulative health risk assessment of co-occurring mycotoxins of deoxynivalenol and its acetyl derivatives in wheat and maize: case study, Shanghai, China*, Food Chemistry and Toxicology, 74, 2014, s. 334-342.
46. Bottalico A., Perrone G., *Toxigenic Fusarium species and mycotoxins associated with head blight in small grain cereals in Europe*, European Journal of Plant Pathology, 108, 2002, s. 611-624.
47. Marasas W.F.O., Leistner L., Hofmann G., Eckardt C., *Occurrence of toxigenic strains of Fusarium in maize and barley in Germany*, European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, 7, 1979, s. 289-306.
48. Bennett J.W., Klich M., *Mycotoxins*, Clinical Microbiology Review, 36, 2003, s. 497-516.
49. Gromadzka K., Waśkiewicz A., Chełkowski J., Goliński P., *Zearalenone and its metabolites: occurrence, detection, toxicity and guidelines*, World Mycotoxin Journal, 1(2), 2008, s. 209-220.
50. Mirocha C.J., Christensen C.M., *Fungus metabolites toxic to animals*, Annual Review of Phytopathology, 12, 1974, s. 300-330.
51. Bottalico A., *Fusarium diseases of cereals, species complex and related mycotoxin profiles in Europe*, European Journal of Plant Pathology, 80, 1998, s. 85-103.
52. Hesseltine C.W., *Conditions leading to mycotoxin contamination of foods and feeds*, [w:] Rodricks J.V. (ed.), *Mycotoxins and other fungal related food problems*, Advances in Chemistry, 149, American Chemical Society, Washington 1976.
53. Tuite J., *Field and storage conditions for the production of mycotoxins and geographic distribution of some mycotoxin problems in the United States*, Pardue Agricultural Exhibition Station Journal, 7259, 1979.
54. Wang, E., Ross, F.P., Wilson, T.M., Riley, R.T., Merrill A.H., *Increases in serum sphingosine and sphinganine and decreases in complex sphingolipids in ponies given feed containing fumonisins, mycotoxins produced by Fusarium moniliforme*, Journal of Nutrition, 122, 1992, s. 1706-1716.
55. Task Force Report, *Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems*, Council for Agricultural Science and Technology, Ames (Iowa) 2003.
56. Logrieco A., Visconti A., *An overview on toxigenic fungi and mycotoxins in Europe*, Kluwer Academic Publishers, Boston 2004.
57. Al-Jaal B., Salama S., Al-Qasbi N., Jaganjac M., *Mycotoxin contamination of food and feed in the Gulf Cooperation Council countries and its detection*, Toxicon, 171, 2019, s. 43-50.
58. Rahmani A., Jinap S., Soleimany F., *Qualitative and quantitative analysis of mycotoxins*, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 8, 2009, s. 202-251.
59. Tola M., Kebede B., *Occurrence, importance and control of mycotoxins. A review*, Cogent Food & Agriculture, 2(1), 2016.
60. Swanson S.P., Corley R.A., White D.G., Buck W.B., *Rapid thin layer chromatographic method for determination of zearalenone and zearalenol in grains and animal feeds*, Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 67(3), 1984, s. 580-582.
61. Tanaka T., Hasegawa A., Matsuki Y., Lee U.S., Ueno Y., *Rapid and sensitive determination of zearalenone in cereals by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection*, Journal of Chromatography, 328, 1985, s. 271-278.
62. Kinani S., Bouchonnet S., Bourcier S., Porcher J.M., Ait-Aissa S., *Study of the chemical derivatization of zearalenone and its metabolites for gas chromatography-mass*

- spectrometry analysis of environmental samples, *Journal of Chromatography*, 1190(1-2), 2008, s. 307-315.
63. Cavaliere C., Foglia P., Pastorini E., Samperi R., Lagana A., *Development of a multiresidue method for analysis of major Fusarium mycotoxins in corn meal using liquid chromatography/ tandem mass spectrometry*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19(14), 2005, s. 2085-2093.
64. Iqbal S.Z., *Mycotoxins in food, recent development in food analysis and future challenges; a review*, *Current Opinion in Food Science*, 42, (2021), s. 1-11.
65. Friguet B., Chaffotte A.F., Djavadi-Ohanian L., Goldberg M.E., *Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay*, *Journal of Immunology Methods*, 77(2), 1985, s. 305-319.
66. Smits H.L., Eapen C.K., Sugathan S., Kuriakose M., Gasem M.H., Yersin C., Sasaki D., Pujianto B., Vesterling M., Abdoel T.H., Gussenhoven G.C., *Lateral-flow assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis*, *Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology*, 8(1), 2001, s. 166-169.
67. Polak-Śliwińska M., Kubiak M.S., Borejszo Z., *Metody oznaczania wybranych mikotoksyn w żywności i paszach*, *Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego*, 2, 2014, s. 120-124.
68. Pokrzywa P., Cieślík E., Topolska K., *Ocena zawartości mikotoksyn w wybranych produktach spożywczych*, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 3(52), 2007, s. 139-146.
69. Oueslati S., Berrada H., Manes J., Juan C., *Presence of mycotoxins in Tunisian infant foods samples and subsequent risk assessment*, *Food Control*, 84, 2018, s. 362-369.
70. Tang D., Saucedo J.C., Lin Z., Ott S., Basova E., Goryacheva I., Biselli S., Lin J., Niessner R., Knopp D., *Magnetic nanogold microspheres-based lateral-flow immunodipstick for rapid detection of aflatoxin B2 in food*, *Biosensors and Bioelectronics*, 25(2), 2009, s. 514-518.
71. Lai W., Fung D.Y.C., Yang X., Renrong L., Xiong Y., *Development of a colloidal gold strip for rapid detection of ochratoxin A with mimotope peptide*, *Food Control*, 20(9), 2009, s. 791-795.
72. Kolosova A.Y., Sibanda L., Dumoulin F., Lewis J., Duveiller E., Van Peteghem C., De Saeger S., *Lateral-flow colloidal gold-based immunoassay for the rapid detection of deoxynivalenol with two indicator ranges*, *Analytical Chimica Acta*, 616(2), 2008, s. 235-244.
73. Xu Y., Huang Z.B., He Q.H., Deng S.Z., Li L.S., Li Y.P., *Development of an immunochromatographic strip test for the rapid detection of deoxynivalenol in wheat and maize*, *Food Chemistry*, 119(2), 2010, s. 834-839.
74. Li Y.S., Zhou Y., Lu S.Y., Guo D.J., Ren H.L., Meng X.M., Zhi B.H., Lin C., Wang Z., Li X.B., Liu Z.S., *Development of a one-step test strip for rapid screening of fumonisins B1, B2 and B3 in maize*, *Food Control*, 24(1-2), 2012, s. 72-77.
75. Kolosova A.Y., De Saeger S., Sibanda L., Verheijen R., Van Peteghem C., *Development of a colloidal gold-based lateral-flow immunoassay for the rapid simultaneous detection of zearalenone and deoxynivalenol*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389(7-8), 2007, s. 2103-2107.
76. Liu G., Han Z., Nie D., Yang J., Zhao Z., Zhang J., Li H., Liao Y., Song S., De Saeger S., Wu A., *Rapid and sensitive quantitation of zearalenone in food and feed by lateral flow immunoassay*, *Food Control*, 27(1), 2012, s. 200-205.
77. Molinelli A., Grossalber K., Führer M., Baumgartner S., Sulyok M., Krska R., *Development of qualitative and semiquantitative immunoassay-based rapid strip tests for the detection of T-2 toxin in wheat and oat*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(8), 2008, s. 2589-2594.
78. Adeyeye S.A.O., *Aflatoxigenic fungi and mycotoxins in food: a review*, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60, 2020, s. 709-721.
79. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (text with EEA relevance); Rozporządzenie

- Komisji (WE) Nr 1881/2006 z dnia 19 grudnia 2006r. ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych (tekst mający znaczenie dla EOG).
80. Commission Recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding (text with EEA relevance), 2006/576/EC; Zalecenie Komisji z dnia 17 sierpnia 2006 r. w sprawie obecności deoksynivalenolu, zearalenonu, ochratoksyny A, T-2 i HT-2 oraz fumonizyn w produktach przeznaczonych do żywienia zwierząt (tekst mający znaczenie dla EOG), 2006/576/WE.
  81. Commission Recommendation of 17 August 2006 on the prevention and reduction of *Fusarium* toxins in cereals and cereal products (text with EEA relevance), (2006/583/EC; Zalecenie Komisji z dnia 17 sierpnia 2006 r. w sprawie zapobiegania występowaniu i ograniczania występowania toksyn *Fusarium* w zbożach i produktach zbożowych (tekst mający znaczenie dla EOG), 2006/583/WE.
  82. Commission Regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs (text with EEA relevance); Rozporządzenie Komisji (WE) Nr 401/2006 z dnia 23 lutego 2006 r. ustanawiające metody pobierania próbek i analizy do celów urzędowej kontroli poziomów mikotoksyn w środkach spożywczych (tekst mający znaczenie dla EOG).
  83. Buśko M., Chełkowski J., Popiel D., Perkowski J., *Solid substrate bioassay to evaluate impact of Trichoderma on trichothecene mycotoxin production by Fusarium species*, Journal of the Science of Food and Agriculture, 88, 2008, s. 536-541.
  84. Juan C., Mannai A., Ben Salem H., Oueslati S., Berrada H., Juan-Garcia A., Manes J. *Mycotoxins presence in pre- and post-fermented silage from Tunisia*, Arabian Journal of Chemistry, 13, 2020, s. 6753-6761.
  85. Adegbeye M.J., Reddy P.R.K., Chilaka C.A., Balogun O.B., Elghandour M.M.M.Y., Rivas-Caceres R.R., Salem A.Z.M., *Mycotoxin toxicity and residue in animal products. Prevalence, consumer exposure and reduction strategies. A review*, Toxicon, 177, 2020, s. 96-108.
  86. Benkerroum N., *Mycotoxins in dairy products. A review*, International Dairy Journal, 62, 2016, s. 63-75.

## **Mykotoksyny w żywności – charakterystyka, zagrożenia, metody wykrywania i zapobieganie**

### **Streszczenie**

Bioaktywność mikroorganizmów wytwarza określone substancje o nieznannej lub wtórnej funkcji biologicznej, zwane metabolitami wtórnymi (idiolitamami). Niektóre z nich znalazły praktyczne zastosowanie jako leki lub dodatki do żywności i pasz (np. antybiotyki, alkaloidy, witaminy i bakteriocyny). Inne mogą mieć niekorzystny wpływ (toksyczny, w tym rakotwórczy) na organizmy wyższe (np. toksyny bakteryjne lub mykotoksyny). Producentami mykotoksyn są grzyby nitkowate należące głównie do rodzajów: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Trichoderma*, *Cladosporium* i innych.

Mykotoksyny najczęściej występują w zbożach i ich produktach, orzechach, przyprawach, kawie, kakao, herbatach, suszonych owocach, orzechach, piwie czy winie, a ich synteza zależy od wielu czynników, takich jak rodzaj podłoża, temperatura, wilgotność czy obecność substancji sprzyjających syntezie. Istnieją różne strategie redukcji lub eliminacji mykotoksyn – rozwój odpornych na grzyby odmian rosnących roślin, zwalczanie infekcji polowych, fizyczne i chemiczne inaktywacje lub detoksykacje mykotoksyn itp.

Najważniejsze mykotoksyny to aflatoksyny, ochratoksyny, zearalenon, patulina, trichoteceny i fumonizyny. Wszystkie z maksymalnymi limitami dla szerokiej gamy produktów spożywczych ustalonymi przez UE, od jednostek ppm do ppb (rozporządzenie Komisji (WE) nr 1881/2006 i nr 406/2006; zalecenia Komisji 2006/576/WE, 2006/583/WE i 2006/598/WE). Oficjalne protokoły pobierania próbek do kontroli mykotoksyn w żywności i paszach zostały sporządzone przez Codex Alimentarius i zalecane przez Komisję Europejską (Rozporządzenie Komisji (WE) 401/2006). Szybka analiza mykotoksyn jest wykonywana za

pomocą dostępnego w handlu testu immunoenzymatycznego (ELISA), z wartością półilościową i możliwymi interferencjami krzyżowymi. Przy oficjalnej wartości zaleca się LC lub GC w połączeniu z UV, fluorescencją, MS i MS/MS, uprzednią ekstrakcją, czyszczenie i zateżanie w celu uzyskania dobrej wrażliwości i selektywności. Ciągłe monitorowanie mykotoksyn w produktach spożywczych może zapobiec poważnym problemom w marketingu, dystrybucji i konsumpcji żywności.

Słowa kluczowe: mykotoksyny, żywność pochodzenia roślinnego, analiza, zapobieganie

## **Mycotoxins in food – characteristics, threats, methods of detection and prevention**

### Abstract

The bioactivity of microorganisms produces specific substances of unknown or secondary biological function, called secondary metabolites (idiolites). Some of them have found practical use as drugs or food and feed additives (e.g. antibiotics, alkaloids, vitamins and bacteriocins). Others may have adverse effects (toxic including carcinogenicity) on higher organisms (e.g. bacterial toxins or mycotoxins). Producers of the mycotoxins are filamentous fungi belonging mainly to the genera: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Trichoderma*, *Cladosporium* and others.

Mycotoxins are most often present in cereals and their products, nuts, spices, coffee, cocoa, teas, dried fruit, nuts, beer or wine, and their synthesis depends on many factors, such as the type of substrate, temperature, humidity or the presence of synthesis-promoting substances. There are different strategies for the reduction or elimination of mycotoxins, development of fungal resistant varieties of growing plants, control field infection, physical and chemical inactivation or detoxification of mycotoxins, etc.

The most important mycotoxins are aflatoxins, ochratoxins, zearalenone, patulin, trichothecenes, and fumonisins. All of them with maximum limits for a wide variety of foods set by the EU, ranging from ppm to ppb units (Commission Regulation (EC) No 1881/2006 and No 406/2006; Commission Recommendations 2006/576/EC 2006/583/EC and 2006/598/EC). Official sampling protocols for mycotoxins control in food and feed have been performed by Codex Alimentarius and recommended by the European Commission (Commission Regulation (EC) 401/2006). The rapid mycotoxins analysis is made by commercially available enzyme linked immuno-sorbent assay (ELISA), with semi-quantitative value and with possible cross interferences. With official value, LC o GC linked to UV, fluorescence, MS and MS/MS is recommended, previous extraction, clean-up and concentration for obtain a good sensibility and selectivity. Continuous monitoring of mycotoxins in food products can prevent significant problems in the marketing, distribution, and consumption of foods.

Keywords: mycotoxins, food of plant origin, analysis, dissipation

## Wybrane toksyny a funkcjonowanie organizmu człowieka

### 1. Wstęp

Toksyny są substancjami, które ze względu na pochodzenie, można podzielić na cztery grupy: chemiczne, biologiczne, fizyczne oraz toksyczne promieniowanie. **Chemiczne substancje toksyczne** obejmują substancje nieorganiczne (takie jak rtęć i tlenek węgla) oraz związki organiczne (takie jak alkohol metylowy). **Toksyny biologiczne** są wytwarzane przez organizmy żywe (np. grzyby, bakterie).

Pojęcie toksyczności wiąże się ze skutkiem reakcji, która zachodzi pomiędzy toksyną a układem biologicznym człowieka. Efektem jest każda biologiczna zmiana w organizmie, narządzie i tkance. Efekt szkodliwy jest nieodwracalną zmianą biologiczną, która pojawia się podczas lub po zakończeniu narażenia. Jest to zaburzenie, które może wpływać na wydolność całego organizmu lub może zmniejszyć sprawność jego działania w warunkach dodatkowego obciążenia. Może też zwiększyć wrażliwość organizmu na działanie innych czynników [1]. Efekt toksyczny może mieć charakter ostry, gdy substancja działa bardzo silnie, a efekty są widoczne w krótkim czasie po jednorazowej ekspozycji (od kilku minut do kilku dni) oraz przewlekły (tzw. chroniczny) – kiedy dochodzi do długotrwałego gromadzenia się niskich (i/lub bardzo niskich) dawek substancji w organizmie lub do kumulacji niekorzystnych efektów zdrowotnych [2].

Do czynników wpływających na toksyczność substancji zalicza się właściwości fizykochemiczne, zwane pozaustrojowymi, oraz właściwości organizmu żywego, czyli czynniki biologiczne, tzw. wewnątrzustrojowe.

Wskaźniki, które określają toksyczność to:

- dawka toksyczna ( $TD_{50}$ ) – ilość substancji, która po wchłonięciu do organizmu wywołuje objawy zatrucia i/lub odwracalne zaburzenia czynnościowe organizmu;
- LD – oznacza dawkę śmiertelną (ang. *lethal dose*) i jest oznaczeniem toksyczności danej substancji czy związku chemicznego; mediana dawki śmiertelnej ( $LD_{50}$ ) to dawka wywołująca zgon u 50% organizmów, które poddane zostały działaniu substancji toksycznej;
- LC – oznacza stężenie śmiertelne (ang. *lethal concentration*), stosowane dla substancji gazowych we wdychanym powietrzu; mediana stężenia śmiertelnego ( $LC_{50}$ ) to stężenie gazowej substancji toksycznej wywołujące śmierć u 50% organizmów, które poddane zostały działaniu substancji toksycznej.

Medianę dawki śmiertelnej –  $LD_{50}$  – wykorzystuje się do określenia kategorii toksyczności substancji (adekwatnie do wywoływanego efektu) i prawdopodobieństwa zgonu człowieka.

Celem pracy jest charakterystyka wpływu toksyn pochodzenia biologicznego na organizm człowieka, w którego środowisku życia występują.

<sup>1</sup> aleksandra.galuszka@interia.pl, Wydział Lekarski Uniwersytetu Medycznego w Lublinie.

<sup>2</sup> wojciech.ludwicki@onet.pl, Wydział Mechaniczny Politechniki Lubelskiej.

## 2. Toksyny biologiczne

Toksyny biologiczne są substancjami organicznymi – wytwarzanymi przez niektóre organizmy żywe, drobnoustroje, rośliny, grzyby oraz zwierzęta – działającymi szkodliwie na inne organizmy [3]. W powietrzu atmosferycznym znajdują się między innymi zarodniki i konidia grzybów oraz bakterie i ich przetrwalniki. Organizmy te w wyniku procesów chemicznych wydzielają także różne substancje chemiczne o bardzo złożonym składzie – endotoksyny, enterotoksyny, enzymy i mikotoksyny [4].

Istnieje kilka kryteriów podziału toksyn. Najprostszy podział toksyn opiera się na informacji, czy substancja ta stanowi integralną część strukturalną komórki, czy jest aktywnie wydzielana do środowiska, dlatego wyróżniono endotoksynę (której patologiczne działanie ujawnia się dopiero po rozpadzie komórki) oraz egzotoksynę (która może być wydzielana przez organizmy do otaczającego je środowiska w trakcie ich wzrostu) [5]. Ze względu na miejsce działania toksyn wyróżnia się:

- hemotoksyny (cytotoksyny powodujące degradację erytrocytów);
- hepatotoksyny (cytotoksyny działające toksycznie na wątrobę);
- neurotoksyny (działające na układ nerwowy);
- dermatotoksyny (wywołujące zmiany skórne);
- nefrotoksyny (działające toksycznie na komórki) [6].

Obok toksyn w środowisku człowieka znajdują się substancje toksyczne chemicznie zdefiniowane. Substancje te mogą powodować narażenie bądź uszkodzenie zdrowia. Mogą to być substancje organiczne lub nieorganiczne, które powstają również w wyniku działalności człowieka.

Obecnie opracowany został system oceny potencjalnej toksyczności substancji chemicznych. Do dokonania jej służy określenie tak zwanego progu istotności toksycznej TTC (ang. *threshold of toxicological concern*), który pozwala na ocenę bezpieczeństwa substancji chemicznych. Większość z nich w pewnych ilościach nie wykazuje niekorzystnych efektów zdrowotnych. Gdy jednak substancja zostanie użyta w ilościach przekraczających dawki określone jako bezpieczne, mogą wystąpić efekty niepożądane [7]. Zdefiniowano sześć klas toksyczności substancji chemicznych, dla których ustalono dawki śmiertelne dla człowieka. Najwyższy stopień toksyczności reprezentują związki zaliczone do klas I i II. Określono je jako nadzwyczaj toksyczne i silnie toksyczne [8-10].

## 3. Wybrane toksyny biologiczne

### 3.1. Mykotoksyny

Mykotoksyny to farmakologicznie aktywne metabolity pleśni charakteryzujące się toksycznością. Substancje te klasyfikowane są w kilku niepowiązanych ze sobą klasach chemicznych. Sposób ich wytwarzania jest specyficzny – w zależności od szczepu. Pleśnie i grzyby to poważny problem występujący w pomieszczeniach, gdzie bytuje człowiek – mieszkaniu, miejscu pracy, nauki i tak dalej. Zazwyczaj rozwijają się one w ciepłych, wilgotnych oraz zacienionych miejscach. Dlatego doskonałym miejscem rozwoju pleśni i grzybów są przestrzenie między ścianą a meblami, spód wykładzin, łazienki. Najczęściej obszary narażone na zagrzybienie są niezauważalne, co powoduje późne zdiagnozowanie tego problemu. Toksyny wytwarzane przez grzyby, czyli mykotoksyny, mogą rozprzestrzeniać się w całej atmosferze pomieszczeń mieszkalnych, powodując poważne komplikacje zdrowotne w postaci zaburzeń czynności poszczegół-



nych narządów, jak i całych układów [11]. Dotychczas, jak podają źródła, zidentyfikowano około 400 mykotoksyn, wśród których najlepiej poznane to aflatoksyny, ochratoksyny, trichoteceny, fumonizyny, zearalenon oraz patulina [12].

Alfatoksyny mogą występować w produktach rolnych, gdy są przechowywane w nieodpowiednich warunkach [13]. W Polsce aflatoksyny występują głównie w importowanych orzechach, kukurydzy oraz innych produktach pochodzących z krajów o klimacie tropikalnym i subtropikalnym [14].

Ochratoksyna A (OTA) wykrywana jest najczęściej w surowcach źle wysuszonych oraz składowanych w nieodpowiednich warunkach wilgotności i temperatury, a także w niektórych fermentowanych produktach [15].

Patulinę wykrywa się zazwyczaj w jabłkach i soku jabłkowym, a w mniejszym stopniu w owocach z objawami brązowej zgnilizny (ang. *brown rot*), takich jak: banany, ananasy, winogrona, brzoskwinie, morele i pomidory [16].

Mykotoksyny są odporne na działanie wysokiej temperatury. Smażenie, pieczenie, gotowanie czy pasteryzacja nie usuwają ich z produktów żywnościowych. Dlatego w sytuacji stwierdzenia pleśni na żywności – nie należy jej spożywać ani odkrawać fragmentów bezpośrednio objętych pleśnią i wykorzystywać do spożycia pozostałej części, ponieważ wyprodukowana w niej toksyna – patulina – znajduje się w każdym najmniejszym kawałku produktu, choć nie jest widoczna gołym okiem.

### 3.1.1. Wpływ mykotoksyn na człowieka

Mykotoksyny dostają się do organizmu drogą inhalacyjną i przez skórę, jednak do zatrucia dochodzi najczęściej po spożyciu skażonej żywności. Niestety, nie istnieją charakterystyczne objawy zatrucia – mykotoksyny mogą wywoływać skomplikowane i nakładające się na siebie objawy wynikające z niekorzystnego ich wpływu na wiele układów i narządów (choroby nowotworowe, podrażnienia skóry, hamowanie syntezy białek, immunosupresję i inne zaburzenia metaboliczne) [11]. Aflatoksyny uszkadzają przede wszystkim nerki i ośrodkowy układ nerwowy. Powodują uszkodzenie oraz nowotwory wątroby. Objawy chorobowe zależą od częstotliwości ekspozycji oraz pochłoniętej dawki. Można obserwować krótkotrwałe zatrucia dużą ilością toksyn lub wieloletni, przewlekły proces zatrucia organizmu mniejszymi dawkami [17]. Mykotoksyny posiadają także negatywny wpływ na układ oddechowy. Aflatoksyny wywołują i nasilają różnorodne objawy alergiczne, takie jak: nieżyt nosa, zmiany skórne, astma oskrzelowa, alergiczne zapalenie płuc [18]. Długotrwałe oddziaływanie mykotoksyn, w skrajnych przypadkach może prowadzić do śmierci.

Wielu badaczy podkreśla epidemiologiczną zależność między stopniem narażenia na mykotoksyny a częstością rozwoju niektórych nowotworów – raka przełyku, żołądka, pierwotnego raka wątroby, nowotworów płaskonabłonkowych głowy i szyi, tkanek miękkich oraz ostrych i przewlekłych białaczek [19].

### 3.2. Apitoksyna – jad pszczoły

Apitoksyna – jad pszczoły miodnej (*Apis mellifera*) jest toksyną wydzielaną przez pszczoły w celu obrony przed drapieżnikami. Po użądleniu człowieka pszczoła ginie, ponieważ nie jest w stanie wyciągnąć żądła z ludzkiej skóry. Zdolność żądlenia posiadają pszczoły robotnice oraz pszczoła matka, trutnie nie mają żądeł. Gruczoł jadowy wykształca się w trzecim tygodniu życia robotnicy. Aby produkować jad musi ona

odżywiać się pyłkiem, bez niego wytworzenie apitoksyny nie jest możliwe [20]. Na świeży jad pszczele składa się 88% wody i około 0,1  $\mu\text{g}$  „suchego jadu” [21]. „Suchy jad” to głównie białka i peptydy, których jest około 80% [22]. Aktywne składniki jadu pszczelego to między innymi: melityna (ang. *melittin*), apamina (ang. *apamin*), MCD (ang. *mast cell degranulating*), hialuronidaza (ang. *hyaluronidase*), lizofosfataza, fosfolipaza B (ang. *phospholipase B*),  $\alpha$ -glukozydaza (ang.  *$\alpha$ -glucosidase*), kwaśna fosfataza (ang. *acid phosphatase*). Mimo wykorzystania w leczeniu, nieznanym jest pełny skład jadu pszczelego, brak także jednolitych wytycznych dotyczących jego standaryzacji [23].

### 3.2.1. Wpływ apitoksyny na człowieka

Melityna wykazuje działanie biologiczne, farmakologiczne i toksyczne. Jest odpowiedzialna za rozkład i zabijanie komórek oraz ból po użądleniu [24]. Powoduje stan zapalny i zmniejsza krzepliwość krwi. W małych dawkach posiada działanie przeciwzapalne, przeciwbakteryjne, a w dużych hamuje aktywność ośrodkowego układu nerwowego, podwyższa ciśnienie i zaburza pracę serca [25]. Apamina blokuje receptory alfa-adrenergiczne, cholinergiczne, purynergiczne i wpływa na przewodzenie potasu w błonach komórkowych. Wywiera pobudzający wpływ na podwzgórze i korę mózgową poprzez stymulowanie wydzielania noradrenaliny, a jej działanie ogólnoustrojowe związane jest z poprawą pamięci i zdolności poznawczych [26]. Peptyd wywołujący degradację mastocytów MCD – w większych dawkach wykazuje działanie antyalergiczne, ale miejscowe działanie prozapalne [27]. Adolapina (ang. *adolapin*) wykazuje wyraźne działanie przeciwzapalne. Hialuronidaza wykazuje działanie prozapalne, proangiogenne, ułatwia rozprzestrzenianie się jadu oraz ma działanie immunostymulujące. Stanowi najbardziej alergenny i immunogeny związek zawarty w apitoksynie. Część składników jadu pszczelego jest cytotoksyczna [28]. Głównymi alergenami jadu pszczelego są: fosfolipaza, hialuronidaza i melityna. Enzymy te u osób podatnych mogą wywołać odpowiedź immunologiczną z udziałem IgE. Użądlenie przez pszczołę może wywołać normalną reakcję, czyli rumień, obrzęk i ból. Może też być przyczyną nadmiernej reakcji miejscowej (kiedy obrzęk trwa powyżej 24 godzin) lub przyjąć postać ciężkiego wstrząsu anafilaktycznego (obejmującego objawy ze strony układu oddechowego, pokarmowego, krążeniowego i nerwowego) i prowadzić nawet do śmierci [29].

### 3.3. Botulinotoksyna – jad kiełbasiany

Toksyny jadu kiełbasianego należą do najsilniejszych neurotoksyn [30] ( $\text{LD}_{50}$  wynosi 1 ng/kg).

Opisano kilka mechanizmów zatrucia neurotoksynami botulinowymi. Najpowszechniejszy jest botulizm pokarmowy, zwany klasycznym. Zazwyczaj dochodzi do niego wskutek przypadkowego spożycia spor – form przetrwalnikowych bakterii pochodzących z pokarmów pakowanych bez dostępu powietrza (szczególnie w wąskim przedziale pH 7,0-7,3). Efekt toksyczny wynika z blokowania wydzielania acetylocholino do szczeliny synaptycznej. W związku z tym neuroprzebieg działa na poziomie płytki nerwowo-mięśniowej – w motoneuronach i synapsach układu współczulnego [31].

Jednak, pomimo ich wysoce trującego działania, znajdują szerokie zastosowanie w terapii medycznej (przy leczeniu na przykład nadczynności cholinergicznym zakończeń nerwowych) oraz w kosmetyce (do korekcji zmarszczek) [32]. Współcześnie wyróżnia się siedem serotypów toksyny botulinowej oznaczonych literami A, B, C, D, E, F, G [33].

### 3.3.1. Wpływ toksyny botulinowej na człowieka

Działanie toksyny botulinowej polega na hamowaniu wydzielania acetylocholino w połączeniach nerwowo-mięśniowych, co prowadzi do paraliżu mięśni [34]. Serotyp A, B oraz E prowadzi u człowieka do botulinizmu oraz do porażień wiotkich [35]. Do wywołania objawów zatrucia wystarczy zaledwie 0,001 µg botuliny/kg masy ciała [36]. Dawka śmiertelna dla mężczyzny ważącego 70 kg wynosi – w przeliczeniu na czystą toksynę botulinową typu A przyjętą drogą doustną – 70 µg [37]. Objawy kliniczne pojawiają się najczęściej po czasie od 12 do 36 godzin od spożycia zainfekowanego pokarmu, ale czas ten może wynosić od 2 godzin do 14 dni [38, 39]. Pierwszymi objawami choroby są symetryczne niedowłady lub porażenia nerwów czaszkowych. W dalszej kolejności pojawia się zstępujący wiotki niedowład czterokończynowy z porażeniem mięśni klatki piersiowej i przepony, co prowadzi do niewydolności oddechowej. Do objawów uszkodzenia autonomicznego układu nerwowego należą: suchość błon śluzowych jamy ustnej i gardła, przekrwienie spojówek, ortostatyczne spadki ciśnienia tętniczego, zaburzenia oddawania moczu i perystaltyki jelit [40, 41].

### 3.4. Toksyny sinicowe

Nie wszystkie gatunki sinic produkują związki toksyczne (występują gatunki powszechnie wykorzystywane w przemyśle spożywczym lub kosmetycznym, na przykład sinice z rodzaju *Arthrospira*, o handlowej nazwie – Spirulina) [42]. Niektóre sinice w obrębie jednego gatunku będą posiadały szczepy toksyczne oraz nietoksyczne [43]. Toksyny normalnie nie są wydzielane do środowiska, znajdują się one w cytoplazmie. Uwalniane są, gdy komórki sinic starzeją się i tracą swoją zawartość. W warunkach naturalnych po wydostaniu się z komórki ulegają natychmiastowemu rozcieńczeniu do stężeń niezagrażających zdrowiu i życiu [44]. Największe ilości toksyn uwalniane są podczas lizy komórki, do której masowo dochodzi w okresach „zakwitów” sinic [45]. Ze względu na charakter oddziaływania wyróżnia się związki hepatotoksyczne, cytotoksyczne, neurotoksyczne i dermatotoksyczne [46, 47].

Toksyny sinicowe stanowią realne zagrożenie dla zdrowia człowieka. Istnieje szereg dróg narażenia na sinice i ich cyjanotoksyny. Najczęściej do zatrucia dochodzi drogą pokarmową, w wyniku spożycia skażonej wody pitnej, jeziornej lub morskiej i organizmów wodnych (skorupiaków, małży, ryb, jadalnych alg), które skumulowały w tkankach toksyny lub na ich powierzchni występują toksyczne sinice [48].

#### 3.4.1. Wpływ toksyn sinicowych na człowieka

Hepatotoksyny powodują takie objawy jak: gorączka, wymioty i biegunka [42], natomiast skórna ekspozycja na nie daje objawy podrażnienia, wysypki i stanów zapalenia skóry [49, 50].

Cytotoksyny mogą wykazywać działanie genotoksyczne, prowadzić do zmian w chromosomach i pęknięcia nici DNA [51]. U ssaków zatrucie może powodować nowotwory wątroby, nerek, grasicy i wady serca [52].

Neurotoksyny uszkadzają układ nerwowy. Działają bardzo szybko po ekspozycji (czas od przyjęcia substancji do wystąpienia objawów jest najczęściej krótszy niż 30 minut). Wywołują objawy ze strony układu nerwowego i oddechowego. W zatruciu obserwuje się: skurcze mięśni, biegunkę, wymioty, otępienie, oszołomienie, paraliż oraz śmierć

(najczęściej z powodu niewydolności oddechowej). W przypadku anatoksyny-a(s) występują również ślinotoki.

Dermatotoksyny oddziałują miejscowo w wyniku zetknięcia skóry lub błony śluzowej z drażniącą substancją. Powodują reakcje uczuleniowe skóry, podrażnienia, pęcherze, złuszczenie. Przypadkowe połknięcie powoduje objawy chorobowe układu pokarmowego oraz gorączkę. Lyngbyatoksyna jest także promotorem chorób nowotworowych [53].

#### 4. Podsumowanie

W ciągu całego życia na organizm człowieka oddziałuje wiele różnych substancji toksycznych. Przyjmujemy je wraz z pożywieniem, wdychamy, wcieramy. Narażeni jesteśmy na nie, spożywając pokarmy oraz żyjąc we współczesnym, zanieczyszczonym środowisku. Jesteśmy biologicznie wyposażeni w mechanizmy pozwalające nam neutralizować i eliminować toksyny, co zapobiega ich akumulacji, która szkodzi tkankom.

Do tej obrony służą wątroba i nerki. Najwięcej szkodliwych substancji wydalamy z moczem. Warto zwracać uwagę na sygnały płynące z organizmu, zwłaszcza jeżeli podobne objawy, mogące świadczyć o gromadzeniu się toksyn, nie występowały wcześniej, na przykład dolegliwości bólowe, wysypka na skórze, zmiana zabarwienia śluzówek czy chroniczny katar.

#### Literatura

1. Sieńczuk W., *Toksykologia współczesna*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2017.
2. Piotrowski J., *Podstawy toksykologii. Kompendium dla studentów szkół wyższych*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2017.
3. Wojnowski J., red., *Wielka Encyklopedia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005.
4. Gołofit-Szymczak M., Skowron J. *Zagrożenia mikrobiologiczne w pomieszczeniach biurowych*, Bezpieczeństwo Pracy, 3, 2005. s. 29-31.
5. Futoma-Kołołoch B., *Toksyny bakteryjne jako czynniki wirulencji. Część I. Lipopolisacharyd (LPS) jako endotoksyna*, Laboratorium, 7-8, 2010, s. 28-31.
6. Zakrzewski S.F., *Podstawy toksykologii środowiska*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1997.
7. Grys A., Łowicki Z., Gryszczyńska A., Kania M., Parus A., *Rośliny zielarskie w leczeniu chorób skóry – bezpieczeństwo i zastosowanie*, Postępy Fitoterapii, 3, 2011. s. 191-196.
8. Sadowska A., *Rakotwórcze i trujące substancje roślinne*, Wydawnictwo SGGW, Warszawa 2004.
9. Bohne B., Dietze P., *Rośliny trujące*, Wydawnictwo Bellona, Warszawa 2008.
10. Jaraczewska W., Kruszewska S., *Zatrucia w domu i otoczeniu. Zapobieganie i pomoc przedlekarska*, Ostre Zatrucia. Informacja Ekspresowa, 2, 2003, s. 1-14.
11. Zain M.E., *Impact of mycotoxins on humans and Animals*, Journal of Saudi Chemical Society, 2011, 15(2), s. 129-144.
12. Czerwiecki L., *Mikotoksyny w żywności jako czynnik zagrożenia zdrowotnego*, Żywność, Żywnienie a Zdrowie, 4, 1997, s. 2.
13. Pittet A., *Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds – an updated review*, Revista de Medicina Veterinaria, 149(6), 1998, s. 479-492.
14. Kowalska A., Walkiewicz K., Kozieł P., Muc-Wierzoń M., *Aflatoksyny – charakterystyka i wpływ na zdrowie człowieka*, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 71, 2017, s. 315-327.

15. Pokrzywa P., Cieślak E., Topolska K., *Ocena zawartości pikrotoksyn w wybranych produktach spożywczych*, Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 3(52), 2007, s.139-146.
16. Szymczyk K., Szteke B., Goszcz H., *Występowanie patuliny w krajowych sokach jabłkowych*, Roczniki PZH, 3, 2004, s. 255-260.
17. Pierzynowska J., Grzesiuk E., *Mutagenność i kancerogenność aflatoksyny AFB1*, Postępy Biochemii, 45, 1999, s. 313-319.
18. Wiszniewska M., Walusiak J., Gutarowska B., Żakowska Z., Pałczyński C., *Grzyby pleśniowe w środowisku komunalnym i w miejscu pracy – istotne zagrożenie zdrowotne*, Medycyna Praktyczna, 55, 2004, s. 2.
19. Namaratha P.K., Urooj A., *Nutritional implications in head and neck cancer – a review*, Indian Journal of Nutrition, 1, 2014, s.103.
20. Tichonow A.I., Bednarczuk L.I., Tichonowa S.A., Sodzawiczny K., Juriewa A.B., Skrypnik-Tichonow R.I., Michajczenko W.W., Czernaja N.A., *Jad pszczeleli w farmacji i medycynie. Teoria, technologia, zastosowanie lecznicze*, Wydawnictwo Apipol-Farma, Kraków 2011.
21. Wehbe R., Frangieh J., Rima M., Obeid D., Sabatier J.M., Fajloun Z., *Bee venom, overview of main compounds and bioactivities for therapeutic interests*, Molecules, 24(16), 2019, s. 2997.
22. Hossen S., Shapla U.M., Gan S.H., Khalil M.I., *Impact of bee venom enzymes on diseases and immune responses*, Molecules, 22(1), 2016, s. 25.
23. Matysiak J., Dereziński P., Klupczyńska A., Coichocki M., Kokot Z., *Wpływ jadu pszczelego na aktywność CYP1A2*, Medycyna Weterynaryjna, 70(12), 2014, s. 781-785.
24. Chen J., Guan S., Sun W., Han F., *Melittin, the Major Pain-Producing Substance of Bee Venom*, Neuroscience Bulletin, 32(3), 2016, s. 265-272.
25. Matysiak J., Matysiak J., Kokot Z. J., *Właściwości farmakologiczne jadu pszczelego*, Nowiny Lekarskie, 77(6), 2008, s. 453-458.
26. Moreno M. Giralt E., *Three valuable peptides from bee and wasp venoms for therapeutic and biotechnological use: melittin, apamin and mastoparan*, Toxins, 7(4), 2015, s. 1126-1150.
27. Pucca M.B., Cerni F.A., Oliveira I.S., Jenkins T.P., Argemi L., Sorensen T.V., Ahmadi S., Barbosa J.E., Laustsen A.H., *Bee updated – current knowledge on bee venom and bee envenoming therapy*, Frontiers in Immunology, 10, 2019, s. 2090.
28. Czarnetzki B.M., Thiele T., Rosenbach T., *Evidence for leukotrienes in animal venoms*, Journal of Allergy and Clinical Immunology, 85(2), 1990, s. 505-509.
29. Łukasiewicz A., *Zastosowanie jadu pszczelego w kosmetologii*, Aesthetic Cosmetology and Medicine, 10(1), 2021, s. 23-31.
30. Mazurkiewicz-Pisarek A., Piucienniczak A., *Toksyna botulinowa – cudowna trucizna*, Biotechnologia, 2(85), 2009, s.123-133.
31. Jasińska E., Gross A., Kołodziejaska E., *Zatrucie jadem kielbasianym. Opis przypadku*, Aktualności Neurologiczne, 14(3), 2014, s. 199-202.
32. Kołodziejczyk A., *Naturalne związki organiczne*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2013, s. 248-249.
33. Car H., Bienias K., Koprowicz T., *Różnice w preparatach toksyny botulinowej typu A stosowanych w dermatologii estetycznej*, Dermatologia Estetyczna, 4(81), 2012, s. 222-227.
34. Madigan M., Martinko J., Parker J., *Brock biology of microorganism*, Prentice-Hall, Upper Saddle River, New York 1997, s. 802-803.
35. Chalicka-Jasionowska K., Wróblewska I., *Toksyna botulinowa typu A i – zastosowanie w medycynie estetycznej*, Puls Uczelni, 7(3), 2013, s. 34-36.
36. Ciszowski K., Gawlikowski T., *Toksyny jako broń biologiczna*, cz. 1, [w:] Pach J., Konieczny J. (red.), *Medyczne czynności ratunkowe w zatruciach i skażeniach chemicznych*, Garmond Oficyna Wydawnicza, Inowrocław 2008.

37. Arnon S.S., Schechter R., Inglesby T.V., Henderson D.A., Barlett J. G., Ascher M.S., Eizen E., Fine A.D., Hauer J., Layton M., Lillybride S., Osterholm T., O'Toole T., Parker G., Perl T.M., Russell P.K., Swerdlow D.L., Tonat K., *Botulism toxin as a biological weapon – medical and public health management*, JAMA, 285, 2001, s. 1059-1070.
38. Bielec D., Semczuk G., Lis J., Firych J., Modrzewska R., Janowski R., *Epidemiologia i klinika zatruc jadem kielbasianym chorych leczonych w Klinice Chorób Zakaźnych Akademii Medycznej w Lublinie w latach 1990–2000*, Przegląd Epidemiologiczny, 56, 2002, s.435-442.
39. Przybylska A., *Zatrucia jadem kielbasianym w 2002 roku*, Przegląd Epidemiologiczny, 58, 2004, s. 103-110.
40. Czerwiński M., Czarkowski M.P., Kondej B., *Zatrucia jadem kielbasianym w 2004 roku*, Przegląd Epidemiologiczny, 60, 2006, s. 465-470.
41. Czerwiński M., Czarkowski M.P., Kondej B., *Zatrucia jadem kielbasianym w 2007 roku*, Przegląd Epidemiologiczny, 63, 2009, s. 237-240.
42. Belay A., *The Potential application of Spirulina (Arthrospira) as a nutritional and therapeutic supplement in health management*, Journal of the American Nutraceutical Association, 5, 2002, s. 27-48.
43. Mazur-Marzec H., Browarczyk-Matusiak G., Forycka K., Kobos J., Pliński M., *Morphological, genetic, chemical and ecophysiological characterisation of two Microcystis aeruginosa isolates from the Vistula Lagoon, southern Baltic*, Oceanologia, 52, 2010, s. 127-156.
44. Kabziński A.K.M., *Badanie obecności toksyn sinicowych w wodach powierzchniowych Polski*, Przegląd Geologiczny, 53(11), 2005, s. 1067-1068.
45. Svrcek C., Smith D.W., *Cyanobacteria toxins and the current state of knowledge on water treatment options. A review*, Journal of Environmental Sciences, 3, 2004, s. 155-185.
46. Codd G., Morrison L.F., Metcalf J.S., *Cyanobacterial toxins: risk management for health protection*, Toxicology and Applied Pharmacology, 203, 2005, s. 264-272.
47. World Health Organization, *Guidelines for drinking water quality, 2nd ed. Health criteria and other supporting information*, vol. 2, WHO, Geneva 1999.
48. Rzymski P., *Wpływ toksyn sinicowych na zdrowie człowieka*, Nowiny Lekarskie, 78(5-6), 2009, s. 353-355.
49. Duy T.N., Lam P.K.S., Shaw G., Connell D.W., *Toxicology and risk assessment of freshwater cyano-bacterial (bluegreen algal) toxins in water*, Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 163, 2000, s. 113-186.
50. Rao P.V.L., Gupta N., Bhaskar A.S.B., Jayaraj R., *Toxins and bioactive compounds from cyanobacteria and their implications on human health*, Journal of Environmental Biology, 23, 2002, s. 215-224.
51. Humpage A.R., Fenech M., Thomas P., Falconer L.R., *Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin*, Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 472, 2000, s. 155-164.
52. Wiegand C., Pflugmacher S., *Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites. A short review*, Toxicology and Applied Pharmacology, 203, 2005, s. 201-218.
53. Gałczyński Ł., Ociepa A., *Toksyny wytwarzane przez sinice*, Biological Chemistry and Engineering, 15(1), 2008, s. 69-76.

## Wybrane toksyny a funkcjonowanie organizmu człowieka

### Streszczenie

Toksyny to naturalne trucizny, które pochodzą od roślin, organizmów zwierzęcych albo są wydzielane przez drobnoustroje. Pojęcie odnosi się do substancji, które mogą działać szkodliwie na organizmy żywe. Te, które pochodzą od zwierząt określa się zootoksynami, zaś pochodzące od roślin – fitotoksynami. Do zootoksyn należą: proteazy, hialuronidazy oraz białka (głównie enzymy). Do fitotoksyn zalicza się: polipeptydy, alkaloidy i glikozydy cyjanogenne. Skutki biologiczne przyjęcia toksyny zależą od jej ilości. Dawkę progową określa się jako *dosis minima* i jest to dawka dająca pierwsze obserwowalne skutki, stanowi najmniejszy poziom narażenia. Dawka śmiertelna (*dosis letalis*) to ilość toksyny powodująca śmierć. Pośrednie ilości toksyny określone są jako *dosis therapeutica* – dawka lecznicza (niezakłócająca procesów fizjologicznych) oraz *dosis toxica* – ilość dająca efekt toksyczny, ale niepowodująca śmierci. Toksyny mogą dostawać się do organizmu różnymi drogami: wziewną, pokarmową, przez jamy ciała (jama ustna, nosowa, pochwa, dospójkowo), przez skórę, iniekcyjnie (dożylnie, podskórną, domięśniowo) oraz prenatalnie. W przypadku nagromadzenia toksyn w organizmie człowieka – pojawiają się pewne objawy, zwłaszcza na początku ich wystąpienia, są one bagatelizowane. Tłumaczy się je przemęczeniem lub doświadczaniem stresu w codziennym funkcjonowaniu. Do najczęstszych objawów należą senność, apatia, nieustające zmęczenie, objawy depresyjne, bóle brzucha, nudności, biegunki, problemy z trawieniem, wypadające włosy, łamliwe paznokcie, wysypki i egzemy, powstawanie stanów zapalnych, zwiększona podatność na próchnicę, świąd, nadmierna potliwość, obrzęki skórne oraz problemy ze zrzuceniem wagi. Objawy są różnorodne.

Słowa kluczowe: toksyny, poziom toksyczności, mykotoksyny, apitoksyna, botulinotoksyna, toksyny sinicowe

## Selected toxins and human body functions

### Abstract

Toxins are natural poisons that come from plants, animal organisms, or are secreted by microorganisms. The term refers to substances that can harm living organisms. Those that originate from animals are called zoo-toxins, while those that originate from plants are called phytotoxins. Zoo toxins include: proteases, hyaluronidases and proteins (mainly enzymes). Phytotoxins include: polypeptides, alkaloids and cyanogenic glycosides. The biological effects of ingesting a toxin depend on the amount of toxin. The threshold dose is referred to as *dosis minima* and is the dose that produces the first observable effects and represents the lowest level of exposure. The lethal dose (*dosis letalis*), is the amount of toxin that causes death. Intermediate amounts of toxin are defined as: *dosis therapeutica* – a therapeutic dose that does not interfere with physiological processes, and *dosis toxica* – an amount that produces a toxic effect but does not cause death. Toxins can enter the body through various routes: inhalation, ingestion, body cavities (oral, nasal, vaginal, conjunctival), through the skin, injection (intravenously, subcutaneously, intramuscularly) and prenatally. When toxins accumulate in the human body, certain symptoms appear, but especially at the beginning of their occurrence, they are downplayed. They are explained by being overtired or experiencing stress in daily functioning. The most common symptoms include lethargy, apathy, constant fatigue, depressive symptoms, abdominal pain, nausea, diarrhea, digestive problems, hair loss, brittle nails, rashes and eczema, inflammation, increased susceptibility to tooth decay, itching, excessive sweating, skin swelling, and trouble losing weight. Symptoms are varied.

Keywords: toxins, toxicity level, mycotoxins, apitoxin, botulinotoxin, cyanobacterial toxins

# ***Fusobacterium nucleatum* jako bakteria symbiotyczna, oportunistyczna i onkogenna**

## **1. Wprowadzenie**

*Fusobacterium nucleatum* to gatunek beztlenowych laseczek Gram-ujemnych. Jest składnikiem mikrobioty ludzkiej zasiedlającym jamę ustną. Odrywa integralną i korzystną rolę w utrzymywaniu właściwego i zdrowego funkcjonowania organizmu gospodarza, pozostając w ścisłym związku nie tylko z komórkami i tkankami ludzkiego ciała, ale także z innymi składnikami mikrobioty. Jednocześnie *F. nucleatum* jest patogenem oportunistycznym, często izolowanym i identyfikowanym u pacjentów z różnymi zakażeniami, charakteryzującym się wieloma mechanizmami zjadliwości. Ponadto jako onkogenny element mikroflory wielokierunkowo przyczynia się do rozwoju, wzrostu i rozprzestrzeniania się raka jelita grubego [1]. Niniejszy artykuł jest podsumowaniem aktualnej wiedzy na temat *F. nucleatum* jako mikroorganizmu mutualistycznego, patogennego i rakotwórczego.

## **2. Systematyka i nisze ekologiczne *Fusobacteriota***

*Fusobacteriota* to odrębny typ bakterii obejmujący drobnoustroje powszechnie występujące w środowisku. Należą do niego gatunki obecne w jamie ustnej człowieka (*Fusobacterium* spp.), w przewodzie pokarmowym i układzie moczowo-płciowym człowieka (odpowiednio *Leptotrichia* spp. i *Sneathia* spp.), w przewodzie pokarmowym ryb i wielorybów (*Cetobacterium* spp.), a także wolno żyjące w środowisku morskim (*Ilyobacter* spp.). Obecnie *Fusobacteria* dzieli się na dwie rodziny: *Leptotrichiaceae*, do których należą rodzaje *Leptotrichia*, *Sneathia*, *Sebaldella* i *Streptobacillus* oraz *Fusobacteriaceae*, w tym morskie i słodkowodne rodzaje *Psychrilyobacter*, *Ilyobacter*, *Propionigenium* i *Cetobacterium* oraz związane z organizmami zwierzęcymi rodzaj *Fusobacterium* [2, 3].

Fusobakterie są Gram-ujemnymi, nie tworzącymi przetrwalników, zwykle nieruchliwymi beztlenowcami, które w obrazie mikroskopowym przybierają kształt stożkowatych laseczek. Niektóre gatunki mogą ujawniać unikalne właściwości metaboliczne, czego przykładem jest *Psychrilyobacter atlanticus*, który rozkłada materiały wybuchowe zawierające nitraminy [2].

Gatunki *Fusobacterium* znajdują się w jamie ustnej i błonach śluzowych ludzi i zwierząt, w tym myszy (*Fusobacterium mortiferum*), makaków (*Fusobacterium simiae*), koni (*Fusobacterium equinum*), a nawet krokodyli (*Fusobacterium* spp.). Ich obecność w zdrowych tkankach potwierdza, że są one naturalnymi składnikami mikrobioty tych gatunków. Ze względu na fakt, że są często izolowane w próbkach klinicznych z tych samych (ale również innych, odległych) tkanek podczas aktywnej choroby, uważa się je również za patogeny oportunistyczne [4].

---

<sup>1</sup> mjanec@kul.pl, Katedra Biologii Molekularnej, Wydział Nauk Ścisłych i Nauk o Zdrowiu, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, www.kul.pl.



Spośród gatunków, które kolonizują organizm człowieka, *F. nucleatum* jest najliczniejszym gatunkiem jamy ustnej. Obecność w innych miejscach ciała jest rzadko wykrywana w normalnych, fizjologicznych warunkach [5]. Systematyka bakterii została przedstawiona w tabeli 1.

Tabela 1. Systematyka *F. nucleatum*

Domena	<i>Bakteria</i>
Typ	<i>Fusobacteriota</i>
Klasa	<i>Fusobacteria</i>
Rząd	<i>Fusobacteriales</i>
Rodzina	<i>Fusobacteriaceae</i>
Rodzaj	<i>Fusobacterium</i>
Gatunek	<i>F. nucleatum</i>

### 3. *F. nucleatum* jako bakteria symbiotyczna

*F. nucleatum* ewoluowała w ścisłym związku z komórkami i tkankami gospodarza, jak również z innymi składnikami mikrobioty. W jamie ustnej jest integralną częścią poddziałkowej płytki nazębnej, gdzie rośnie w postaci wielogatunkowego biofilmu. *F. nucleatum* pełni rolę mikroorganizmu pomostowego, który strukturalnie wspiera relacje gatunków tworzących tę formę wzrostu. Są to oddziaływania pomiędzy kolonizatorami pierwotnymi, takimi jak gatunki *Streptococcus*, z głównie beztlenowymi kolonizatorami wtórnymi, w tym *Porphyromonas gingivalis* i *Agregatibacter actinomyces-comitans*. Dzięki wydłużonemu kształtowi *F. nucleatum* może wchodzić w fizyczne interakcje z wieloma innymi komórkami drobnoustrojów. W przypadku wspólnej hodowli ze *Streptococcus sanguinis* zaobserwowano, że oba gatunki mogą łączyć się w wysoce uporządkowane struktury, w których ponad dziesięć komórek *S. sanguinis* wiąże się z pojedynczą komórką fusobakterii [5, 6].

*F. nucleatum* pośredniczy również w organizacji struktury biofilmu i interakcjach z komórkami gospodarza poprzez ekspresję licznych adhezyn. Najlepiej scharakteryzowaną adhezyną tego gatunku jest RadD. Udowodniono, że RadD pośredniczy w wiązaniu *Streptococcus mutans* przez interakcje z adhezyną SpaP wydzielaną przez ten gatunek, co skutkuje wspólną agregacją obydwu bakterii w biofilmie [7]. Ponadto białko adhezyjne uczestniczy w wiązaniu drożdżaków *Candida albicans*, które również wchodzi w skład mikrobioty jamy ustnej [8].

Oprócz interakcji fizycznych komórki drobnoustrojów w biofilmach tworzą liczne zależności metaboliczne. Przykładem jest wydzielanie ornityny przez *Streptococcus gordonii*, którą metabolicznie wykorzystuje *F. nucleatum* [9].

Pomimo długich i intensywnych badań nad *F. nucleatum* i biofilmami jamy ustnej nadal nie można jednoznacznie stwierdzić, które mikroorganizmy pozostają w bezpośrednim oddziaływaniu z *F. nucleatum* w jego niszy mutualistycznej [10].

Niektóre badania wskazują na pozytywny wpływ *F. nucleatum* na organizm gospodarza, w tym:

- stymulację elementów wrodzonej odpowiedzi immunologicznej poprzez pobudzanie wydzielania  $\beta$ -defensyn, co stanowi swego rodzaju swoisty nadzór immunologiczny powierzchni błony śluzowej i ochronę przed potencjalnymi patogenami;

- pobudzanie inhibitorów proteaz gospodarza, które mogą niwelować uszkodzenia tkanek spowodowane uwalnianiem proteazy neutrofilowej podczas infekcji jamy ustnej, a także potencjalnie zakłócać aktywność proteazową związaną z wirulencją różnych patogenów, takich jak *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* i *Tannerella forsythensis* [1].

#### 4. *F. nucleatum* jako czynnik zakaźny

Podczas gdy *F. nucleatum* charakteryzuje się symbiotycznymi zależnościami z innymi drobnoustrojami mikrobioty, jej interakcje z tkankami ludzkimi – zarówno w jamie ustnej, jak i poza nią – mają charakter zwykle obojętny lub patogenny. *F. nucleatum* stanowi rzadką przyczynę bakteriemii, ponieważ roczna zachorowalność wynosi 0,22-0,34 przypadków na 100 tys. osób. Jednak zaangażowana jest w szerokie spektrum chorób, co więcej – jest jednym z najbardziej rozpowszechnionych gatunków identyfikowanych poza miejscem fizjologicznego występowania, czyli jamą ustną [1].

*F. nucleatum* jest niejednorodnym gatunkiem z pięcioma proponowanymi podgatunkami (*ss*), tj. *ss animalis*, *ss fusiforme*, *ss nucleatum*, *ss polymorphum* i *ss vincentii*, których częstość udziału w poszczególnych chorobach jest zróżnicowana [1]. W tabeli 2 podsumowano udział *F. nucleatum* jako potencjalnego czynnika zakaźnego w różnych schorzeniach.

Tabela 2. Choroby związane z *F. nucleatum*

Infekcje jamy ustnej
przewlekłe zapalenie przyzębia
ostre zapalenie przyzębia
zapalenie dziąseł
infekcje endodontyczne
Patologiczny przebieg ciąży
zapalenie błon płodowych
przedwczesny poród
urodzenie martwego dziecka
sepsa noworodkowa
stan przedrzucawkowy
Choroby układu pokarmowego
rak jelita grubego
nieswoiste zapalenie jelit
zapalenie wyrostka robaczkowego
Inne infekcje i choroby
miażdżyca
tętniak mózgu
zespół Lemierre'a
infekcje dróg oddechowych
ropnie różnych narządów
reumatoidalne zapalenie stawów
choroba Alzheimer'a

## 4.1. Infekcje jamy ustnej

*F. nucleatum* jest jednym z najliczniej występujących gatunków bakterii w jamie ustnej, zarówno u osób chorych, jak i zdrowych osób. Jako składnik biofilmów nazębnych stanowi ważny czynnik zakaźny w zapaleniu przyzębia, ponieważ bezpośrednio kształtuje reakcje obronne gospodarza oraz zwiększa zakaźność innych patogenów [11].

Drobnoustrój ma związek z różnymi postaciami chorób przyzębia, w tym łagodnym, odwracalnym zapaleniem dziąseł oraz zaawansowanymi nieodwracalnymi postaciami paradontozy (przewlekłe zapalenie przyzębia, zlokalizowane ostre zapalenie przyzębia i uogólnione ostre zapalenie przyzębia). Często wiąże się również z infekcjami endodontycznymi, takimi jak martwica miazgi i okołowierzchołkowe zapalenie zęba [12-14]. Częstość występowania *F. nucleatum* wzrasta wraz z nasileniem choroby i postępem stanu zapalnego. Wśród podgatunków – *ss fusiforme* i *ss vincentii* są częściej kojarzone z prawidłowym funkcjonowaniem organizmu, podczas gdy *ss nucleatum* – zwykle z chorobą [15].

*F. nucleatum* wykryto również w ślinie, przy czym jej zawartość jest wyższa u pacjentów z zapaleniem dziąseł i przyzębia w porównaniu ze zdrową grupą kontrolną [16].

Na liczebność *F. nucleatum* w jamie ustnej wpływają czynniki środowiskowe, w tym palenie papierosów, które zwiększa obfitość bakterii zarówno u osób zdrowych, jak i z chorobami przyzębia. Udział *F. nucleatum* wśród pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia zwiększa się dodatkowo w przypadku występowania cukrzycy typu 2 [17, 18].

Zapalenie przyzębia jest chorobą wielodrobnoustrojową. W przypadku współinfekcji *F. nucleatum* z innymi gatunkami jamy ustnej, np. *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* i *Streptococcus* spp., obserwuje się synergizm w nasileniu zjadliwości, co sugeruje, że bakterie działają wspólnie, aby uniknąć inaktywowania przez układ odpornościowy gospodarza i wytworzyć środowisko zapalno-permisywne podczas zapalenia przyzębia [19].

## 4.2. Patologiczny przebieg ciąży

Patologiczny przebieg ciąży to szerokie pojęcie obejmujące przedwczesny poród, zapalenie błon płodowych, przedwczesne pęknięcie błon płodowych, stan przedrzucawkowy, poronienie, opóźnienie wzrostu wewnątrzmacicznego, niską masę urodzeniową, urodzenie martwego płodu oraz posocznicę noworodkową [20]. *F. nucleatum* jest jednym z najbardziej dominujących i rozpowszechnionych gatunków zaangażowanych w tego typu powikłania ciążowe. Potwierdzono, że częstość występowania *F. nucleatum* we krwi pępowinowej noworodków z posocznicą jest co najmniej taka (może być nawet wyższa) jak w przypadku dobrze rozpoznanych u noworodków czynników zakaźnych: *Escherichia coli* i *Streptococcus* grupy B [21]. Patogen został zidentyfikowany w tkankach łożysk i płodów, w tym w płynie owodniowym, błonach płodowych, krwi pępowinowej, w żołądkowych i płucnych aspiratach noworodków ze stanem przedrzucawkowym, z sepsą noworodkową, przedwcześnie urodzonych i martwych [22].

Wykrycie *F. nucleatum* w płynie owodniowym i krwi pępowinowej wskazuje na jego zdolność do rozprzestrzeniania się na łożysko i tkanki płodowe. Zakażenia są również dowodem na to, że bakterie pochodzące z płytki poddziąsłowej matki mogą przemieścić się do łożyska i na płód, prowadząc do ostrego stanu zapalnego, a nawet

jego śmierci. Ponadto udowodniono, że *F. nucleatum* translokuje się z jamy ustnej matki do jamy wewnątrzmacicznej przez krew [23].

Spośród pięciu podgatunków w zakażeniach wewnątrzmacicznych wykryto tylko dwa, z przytłaczającą większością należące do *ss. animalis* oraz nieliczne należące do *ss. polymorphum* [24].

Co ważne, w nieprawidłowym przebiegu ciąży *F. nucleatum* jest często wykrywana w połączeniu z innymi gatunkami zasiedlającymi jamę ustną, co potwierdza, że jest to pierwotne źródło infekcji [25].

### 4.3. Infekcje przewodu pokarmowego

Choroby przewodu pokarmowego wynikające z zakaźności *F. nucleatum* obejmują raka jelita grubego, nieswoiste zapalenie jelit i zapalenie wyrostka robaczkowego.

Wiele badań potwierdza przyczynową rolę fusobakterii w powstawaniu i rozwoju nowotworu jelita grubego. Podobnie jak w przypadku zaburzeń w prawidłowym przebiegu ciąży, *F. nucleatum* jest często wykrywana w połączeniu z innymi gatunkami mikrobioty jamy ustnej [26-28]. Dokładniejsze informacje na temat onkogennej aktywności *Fusobacterium* zostały umieszczone w rozdziale 5.

Z kolei nieswoiste zapalenie jelit zostało uznane za czynnik ryzyka nowotworu jelita grubego. Stąd nie zaskakuje fakt, że te same mikroorganizmy biorą udział w obu chorobach. *F. nucleatum* wykryto w okrężnicy pacjentów z nieswoistym zapaleniem jelit. Ponadto udowodniono, że szczepy *F. nucleatum* izolowane z tkanek objętych zapaleniem pacjentów chorych są bardziej inwazyjne niż te pozyskane ze zdrowych [29].

Wykazano również związek tej bakterii z zapaleniem wyrostka robaczkowego. W tym przypadku także potwierdzone zostało współwystępowanie *F. nucleatum* z innymi taksonami charakterystycznymi dla jamy ustnej [30].

Mechanizmy działania *F. nucleatum* w nieswoistym zapaleniu jelit i zapaleniu wyrostka robaczkowego nie zostały jeszcze wyjaśnione.

### 4.4. Inne infekcje

*F. nucleatum* wiąże się z szerokim spektrum infekcji i zakażeń występujących w obrębie głowy i szyi (zespół Lemierre'a, ostre i przewlekłe zapalenie wyrostka sutkowatego, przewlekłe zapalenie ucha i zatok, zapalenie migdałków, ropnie gardłowe, zapalenie węzłów chłonnych, zapalenie przyzębia), mózgu, płuc, brzucha, miednicy, kości, stawów oraz we krwi [22].

Główną przyczyną zespołu Lemierre'a są *F. necrophorum* i *F. nucleatum*. Jest to rzadka postać infekcji górnych dróg oddechowych z zagrażającym życiu wtórnym septycznym zakrzepowym zapaleniem żył [31].

*F. nucleatum* została powiązana również z chorobami sercowo-naczyniowymi ze względu na częste izolowanie bakterii z blaszek miażdżycowych i naczyń krwionośnych, co z kolei bezpośrednio związane jest z nasileniem choroby przyzębia [32].

Ponadto zakażenia *F. nucleatum* sprzyjają rozwojowi reumatycznego zapalenia stawów i choroby Alzheimera [33].

### 5. *F. nucleatum* jako onkobakteria

Coraz częściej udowadnia się rolę mikrobiologicznych czynników zakaźnych w nowotworzeniu. Szacunkowo 15% przypadków nowotworów na świecie można przypisać udziałowi znanych patogenów bakteryjnych i wirusowych [34].

Rola *F. nucleatum* w onkogenezie została do tej pory najlepiej zbadana i udowodniona eksperymentalnie w odniesieniu do raka jelita grubego. Ostatnie badania dotyczące innych typów raka z możliwym udziałem *F. nucleatum* wskazują na nowotwory w jamie ustnej, głowie i szyi, przełyku, szyjce macicy i w żołądku [4, 26-28].

W przypadku raka jelita grubego obecność *F. nucleatum* w zmienionych chorobowo tkankach wiąże się z pewnymi prawidłowościami:

- współwystępowanie w guzach z innymi drobnoustrojami jamy ustnej, w tym *Peptostreptococcus* spp. i *Leptotrichia* spp.;
- współwystępowanie w tych samych guzach, co gatunki *Campylobacter*, które są istotnymi patogenami żołądkowo-jelitowymi;
- wzrost w postaci wielogatunkowego biofilmu;
- antagonistyczne działanie z pożytecznymi mikroorganizmami tej niszy, takimi jak *Faecalibacterium prausnitzii* [4, 26-28].

Takie obserwacje potwierdzają zasadność kontynuowania badań nad tym, w jaki sposób interakcje między tymi drobnoustrojami, czy to w jamie ustnej, czy w nowotworach jelita grubego, mogą być czynnikiem przyczyniającym się do chorobotwórczości, ale również – jak wykorzystać te zależności w terapii.

*F. nucleatum* wpływa na niekontrolowaną proliferację komórek raka jelita grubego i promuje prozapalne środowisko sprzyjające nowotworzeniu [4]. Znane mechanizmy molekularne onkogenezy z udziałem tej onkobakterii podsumowano w tabeli 3.

Tabela 3. Sposoby promowania środowiska pronowotworowego przez *F. nucleatum* [4]

Indukcja odpowiedzi immunologicznej – aktywacja makrofagów, komórek dendrytycznych i komórek supresorowych pochodzących z linii mieloidalnej (MDSC)
Aktywacja szlaku NF- $\kappa$ B i indukcja ekspresji genów kodujących cytokiny prozapalne, w tym TNF, IL-6, IL-8 i IL-1 $\beta$
Unikanie przeciwnowotworowych odpowiedzi immunologicznych – łączenie adhezyny Fap2 z receptorami TIGIT na limfocytach T i komórkach NK, a tym samym hamowanie cytotoksycznej funkcji tych komórek i ochrona komórek <i>F. nucleatum</i> oraz komórek nowotworowych przed inaktywacją przez komórki odpornościowe

## 6. Mechanizmy wirulencji *F. nucleatum*

Przekształcenie komensalnego drobnoustroju w patogenny (zaangażowany w wiele infekcji zarówno w obrębie jamy ustnej, jak i poza nią) możliwe jest dzięki kilku kluczowym mechanizmom wirulencji. *F. nucleatum* ujawnia cechy patogenności, które można podzielić na dwie grupy: (1) kolonizacja i inwazja oraz (2) wywoływanie odpowiedzi immunologicznej gospodarza [34].

### 6.1. Kolonizacja i inwazja

*F. nucleatum* jest bakterią adhezyjną, która oddziałuje z różnymi gatunkami drobnoustrojów w jamie ustnej, odgrywając kluczową rolę w tworzeniu płytki nazębnej. Patogen koduje kilka adhezyn wykorzystywanych w interakcjach międzygatunkowych, w tym Fap2, RadD i aid1. Bakteria wiąże się również z różnymi komórkami ludzkimi: nabłonkiem i komórkami śródbłonka, granulocytami, monocytami, erytrocytami, fibroblastami, komórkami HeLa i komórkami NK. Interakcje dotyczą również cząsteczek gospodarza takich jak makrocząsteczki śliny, białka macierzy zewnątrzkomórkowej, przeciwciała IgG i kadheryny. Adherentność i inwazja są niezbędnymi mechanizmami

dla kolonizacji, rozpowszechniania, unikania mechanizmów obronnych gospodarza i indukcji odpowiedzi immunologicznej gospodarza [35-38].

Do tej pory zidentyfikowano tylko jedną adhezynę, FadA, która wiąże komórki gospodarza i jest – jak dotąd – najlepiej poznanym czynnikiem wirulencji *F. nucleatum*. FadA wydzielana jest przez dwa blisko spokrewnione gatunki, *F. nucleatum* oraz *F. periodonticum* i jest nieobecna w większości innych gatunków *Fusobacterium*. Adhezyzna jest więc potencjalnym markerem diagnostycznym do swoistego identyfikowania tych dwóch gatunków. FadA jest częściej wykrywana w płytce nazębnej u pacjentów z zapaleniem dziąseł i przyzębia oraz w tkance gruczołaków i komórkach nowotworowych okrężnicy w porównaniu ze zdrową grupą kontrolną [39].

FadA jest nie tylko adhezyną, ale także inwazyją, co umożliwiała przyleganie i inwazję do komórek prawidłowych i nowotworowych. Adhezyzna wiąże się z kadherynami, cząsteczkami łączącymi komórki, w tym z VE-kadheryną komórek śródbłonna i z E-kadheryną w komórkach nabłonkowych i komórkach rakowych jelita grubego. Kadheryny są szeroko rozpowszechnione w różnych tkankach i komórkach, dlatego wiązanie FadA z ludzkimi białkami adhezyjnymi jest prawdopodobnie przyczyną kolonizacji *F. nucleatum* wielu miejsc w organizmie człowieka. FadA poprzez wiązanie z VE-kadheryną w komórkach śródbłonna zwiększa jego przepuszczalność i powoduje rozluźnienie połączeń międzykomórkowych. W ten sposób przyczynia się do bezpośredniej inwazji do komórek gospodarza i inwazji okołokomórkowej. Jest to mechanizm wykorzystywany do układowego rozpowszechniania zakażenia. Co więcej – zjawisko to pozwala na zwiększoną przepuszczalność śródbłonna dla innych bakterii znajdujących się w pobliżu, które mogą przeniknąć i wywoływać zakażenia mieszane poza jamę ustną. W badaniach *in vitro* wykazano, że *F. nucleatum* ułatwia wewnątrz- oraz międzykomórkowe inwazje innych gatunków, takich jak *Streptococcus cristatus* i *E. coli* [35, 40].

## 6.2. Indukcja odpowiedzi gospodarza

Po rozpowszechnieniu *F. nucleatum* poza jamę ustną lub w trakcie zaburzenia układu symbiotycznego – drobnoustrój wywołuje zaostrzenie stanu zapalnego i staje się patogenem. Zakażenia *F. nucleatum* wywołują różne odpowiedzi ze strony gospodarza. Są to przede wszystkim: indukcja ludzkiej beta-defensyny 2 w komórkach nabłonka jamy ustnej poprzez FAD-I, stymulacja czynników predysponujących do miażdżycy przez GroEL oraz aktywacja apoptozy limfocytów przez Fap2 i RadD. *F. nucleatum* jest silnym stymulatorem cytokin zapalnych: IL-6, IL-8 i TNF $\alpha$  [22, 41, 42]. Udowodniono również wpływ inwazyjnych szczepów bakterii na wzrost intensywności wydzielania mucyn przez zainfekowane komórki okrężnicy oraz wpływ na wzrost ekspresji genów kodujących te glikoproteiny (szczególnie MUC2) [4]. Z kolei oddziaływanie *F. nucleatum* z komórkami NK aktywuje odpowiedzi zapalne związane z chorobami przyzębia [43].

W komórkach nowotworowych *F. nucleatum* aktywuje nie tylko geny zapalne, ale także onkogeny i geny Wnt. Udowodniono, że adhezyzna FadA odgrywa kluczową rolę w indukcji tych rakotwórczych odpowiedzi, ponieważ zapobieganie wiązaniu FadA z E-kadheryną blokuje aktywację wymienionych cech onkogenności [22, 44].

## 7. Podsumowanie

*F. nucleatum* to złożony mikroorganizm, który wchodzi w różnorodne interakcje z innymi drobnoustrojami mikrobioty i komórkami gospodarza – zarówno korzystne, jak i szkodliwe. Jako organizm symbiotyczny wykazuje wysoki stopień synergizmu z innymi gatunkami bakterii zaangażowanymi w tworzenie się płytki nazębnej w jamie ustnej. Mimo że *F. nucleatum* stanowi rzadką przyczynę bakteriemii, to związana jest z szerokim spektrum chorób, często rozwijających się poza jamą ustną (miejscem jej fizjologicznego bytowania).

Poszerzanie wiedzy o *F. nucleatum* w kierunku jej mutualistycznego i patogennego sposobu życia oraz rozbieżności fizjologicznych i metabolicznych w obydwu systemach funkcjonowania drobnoustroju można wykorzystać do diagnostyki, w celach profilaktycznych i terapeutycznych zakażeń, z którymi związany jest opisany gatunek bakterii.

## Literatura

1. Allen-Vercoe E., Strauss J., Chadee K., *Fusobacterium nucleatum – an emerging gut pathogen?* Gut Microbes, 2(5), 2011, s. 294-298.
2. Zhao J-S., Manno D., Hawari J., *Psychrilyobacter atlanticus* gen. nov., sp. nov., a marine member of the phylum Fusobacteria that produces H<sub>2</sub> and degrades nitramine explosives under low temperature conditions, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 59, 2009, s. 491-497.
3. Citron D.M., *Update on the taxonomy and clinical aspects of the genus Fusobacterium*, Clinical Infectious Diseases, 35, 2002, s. 22-27.
4. Brennan C.A., Garrett W.S., *Fusobacterium nucleatum – symbiont, opportunist and oncobacterium*, Nature Reviews. Microbiology, 17(3), 2019, s.156-166.
5. Kolenbrander P.E., Palmer R.J., Periasamy S., Jakubovics N.S., *Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance*, Nature Reviews Microbiology, 8, 2010, s. 471-480.
6. Lancy P., Dirienzo J.M., Appelbaum B., Rosan B., Holt S.C., *Corncob formation between Fusobacterium nucleatum and Streptococcus sanguis*, Infection and Immunity, 40, 1983, s. 303-309.
7. Guo L., Shokeen B., He X., Shi W., Lux R., *Streptococcus mutans SpaP binds to RadD of Fusobacterium nucleatum ssp. Polymorphum*, Molecular Oral Microbiology, 32, 2017, s. 355-364.
8. Wu T., Cen L., Kaplan C., Zhou X., Lux R., Shi W., He X., *Cellular components mediating coadherence of Candida albicans and Fusobacterium nucleatum*, Journal of Dental Research, 94, 2015, s. 1432-1438.
9. Sakanaka A., Kuboniwa M., Takeuchi H., Hashino E., Amano A., *Arginine-ornithine antiporter ArcD controls arginine metabolism and interspecies biofilm development of Streptococcus gordonii*, Journal of Biological Chemistry, 290, 2015, s. 21185-21198.
10. Hendrickson E.L., Wang T., Beck D.A., Dickinson B.C., Wright C.J., Lamont R., Hackett M., *Proteomics of Fusobacterium nucleatum within a model developing oral microbial community*, Microbiology Open, 3(5), 2014, s. 729-751.
11. Field C.A., Gidley M.D., Preshaw P.M., Jakubovics N., *Investigation and quantification of key periodontal pathogens in patients with type 2 diabetes*, Journal of Periodontal Research, 47, 2012, s. 470-478.
12. Kistler J.O., Booth V., Bradshaw D.J., Wade W.G., *Bacterial community development in experimental gingivitis*, PLOS ONE, 8(8), 2013, s. 71227.

13. Didilescu A.C., Rusu D., Anghel A., Nica L., Iliescu A., Greabu M., Bancescu G., Stratul S.I., *Investigation of six selected bacterial species in endo-periodontal lesions*, International Endodontic Journal, 45, 2012, s. 282-293.
14. Topcuoglu N., Bozdoğan E., Kulekci G., Aktoren O., *Presence of oral bacterial species in primary endodontic infections of primary teeth*, The Journal of Clinical Pediatric Dentistry, 38(2), 2013, s. 155-160.
15. Lourenço T.G., Heller D., Silva-Boghossian C.M., Cotton S.L., Paster B.J., Colombo A.P., *Microbial signature profiles of periodontally healthy and diseased patients*, Journal of clinical periodontology, 41(11), 2014, s. 1027-1036.
16. Zhou X., Liu X., Li J., Aprecio R.M., Zhang W., Li Y., *Real-time PCR quantification of six periodontal pathogens in saliva samples from healthy young adults*, Clinical Oral Investigations, 19(4), 2015, s. 937-946.
17. Mason M.R., Preshaw P.M., Nagaraja H.N., Dabdoub S.M., Rahman A., Kumar P.S., *The subgingival microbiome of clinically healthy current and never smokers*, The ISME Journal, 9(1), 2015, s. 268-272.
18. Casarin R.C., Barbagallo A., Meulman T., Santos V.R., Sallum E.A., Nociti F.H., Duarte P.M., Casati M.Z., Gonçalves R.B., *Subgingival biodiversity in subjects with uncontrolled type-2 diabetes and chronic periodontitis*, Journal of Periodontal Research, 48(1), 2013, s. 30-36.
19. Kesavalu L., Sathishkumar S., Bakthavatchalu V., Matthews C., Dawson D., Steffen M., Ebersole J.L., *Rat model of polymicrobial infection, immunity, and alveolar bone resorption in periodontal disease*, Infection and Immunity, 75(4), 2007, s. 1704-1712.
20. Casarin R.C., Barbagallo A., Meulman T., Santos V.R., Sallum E.A., Nociti F.H., Duarte P.M., Casati M.Z., Gonçalves R.B., *Subgingival biodiversity in subjects with uncontrolled type-2 diabetes and chronic periodontitis*, Journal of Periodontal Research, 48(1), 2013, s. 30-36.
21. Wang X., Buhimschi C.S., Temoin S., Bhandari V., Han Y.W., Buhimschi I.A., *Comparative microbial analysis of paired amniotic fluid and cord blood from pregnancies complicated by preterm birth and early-onset neonatal sepsis*, PLOS ONE, 8(2), 2013, s. 56131.
22. Han Y.W., *Fusobacterium nucleatum – a commensal-turned pathogen*, Current Opinion in Microbiology, 23, 2015, s. 141-147.
23. Han Y.W., *Can oral bacteria cause pregnancy complications?* Womens Health, 7, 2011, s. 401-404.
24. Barak S., Oettinger-Barak O., Machtei E.E., Sprecher H., Ohel G., *Evidence of periopathogenic microorganisms in placentas of women with preeclampsia*, Journal of Periodontology, 78, 2007, s. 670-676.
25. Han Y.W., *Oral health and adverse pregnancy outcomes – what’s next?* Journal of Dental Research, 90, 2011, s. 289-293.
26. Chen W., Liu F., Ling Z., Tong X., Xiang C., *Human intestinal lumen and mucosa – associated microbiota in patients with colorectal cancer*, PLoS One (PLOS ONE), 7, 2012, s. 39743.
27. Castellarin M., Warren R.L., Freeman J.D., Dreolini L., Krzywinski M., Strauss J., Barnes R., Watson P., Allen-Vercoe E., Moore R.A., *Fusobacterium nucleatum infection is prevalent in human colorectal carcinoma*, Genome Research, 22, 2012, s. 299-306.
28. Kostic A.D., Gevers D., Pedamallu C.S., Michaud M., Duke F., Earl A.M., Ojesina A.I., Jung J., Bass A.J., Taberero J., *Genomic analysis identifies association of Fusobacterium with colorectal carcinoma*, Genome Research, 22, 2012, s. 292-298.
29. Strauss J., Kaplan G.G., Beck P.L., Rioux K., Panaccion R., Devinney R., Lynch T., Allen-Vercoe E., *Invasive potential of gut mucosa-derived Fusobacterium nucleatum positively correlates with IBD status of the host*, Inflammatory Bowel Diseases, 17(9), 2011, s. 1971-1978.



30. Swidsinski A., Dorffel Y., Loening-Baucke V., Theissig F., Ruckert J.C., Ismail M., Rau W.A., Gaschler D., Weizenegger M., Kuhn S., *Acute appendicitis is characterised by local invasion with Fusobacterium nucleatum/necrophorum*, *Gut*, 60, 2011, s. 34-40.
31. Williams M.D., Kerber C.A., Tergin H.F., *Unusual presentation of Lemierre's syndrome due to Fusobacterium nucleatum*, *Journal of Clinical Microbiology*, 41(7), 2003, s. 3445-3448.
32. Elkaïm R., Dahan M., Kocgozlu L., Werner S., Kanter D., Kretz J.G., Tenenbaum H., *Prevalence of periodontal pathogens in subgingival lesions, atherosclerotic plaques and healthy blood vessels. A preliminary study*, *Journal of Periodontal Research*, 43(2), 2008, s. 224-231.
33. Sparks Stein P., Steffen M.J., Smith C., Jich G., Ebersole J.L., Abner E., Dawson D., *3<sup>rd</sup> Serum antibodies to periodontal pathogens are a risk factor for Alzheimer's disease*, *Alzheimer's & Dementia. The Journal of the Alzheimer's Association*, 8(3), 2012, s. 196-203.
34. Parkin D.M., *The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002*, *International Journal of Cancer*, 118, 2006, s. 3030-3044.
35. Han Y.W., *Fusobacterium nucleatum interaction with host cells*, [w:] Kolenbrander P. (red.), *Oral microbial communities. genomic inquiry and interspecies communication*, ASM Press, 2011.
36. Rickard A.H., Gilbert P., High N.J., Kolenbrander P.E., Handley P.S., *Bacterial coaggregation – an integral process in the development of multi-species biofilms*, *Trends in Microbiology*, 11, 2003, s. 94-100.
37. Kaplan A., Kaplan C.W., He X., McHardy I., Shi W., Lux R., *Characterization of aid1, a novel gene involved in Fusobacterium nucleatum interspecies interactions*, *Microbial Ecology*, 68, 2014, s. 379-387.
38. Kaplan C.W., Lux R., Haake S.K., Shi W., *The Fusobacterium nucleatum outer membrane protein RadD is an arginine inhabitable adhesion required for inter-species adherence and the structured architecture of multispecies biofilm*, *Molecular Microbiology*, 71, 2009, s. 35-47.
39. Kaplan C.W., Ma X., Paranjpe A., Jewett A., Lux R., Kinder-Haake S., Shi W., *Fusobacterium nucleatum outer membrane proteins Fap2 and RadD induce cell death in human lymphocytes*, *Infection and Immunity*, 78, 2010, s. 4773-4778.
40. Xu M., Yamada M., Li M., Liu H., Chen S.G., Han Y.W., *FadA from Fusobacterium nucleatum utilizes both secreted and nonsecreted forms for functional oligomerization for attachment and invasion of host cells*, *The Journal of Biological Chemistry*, 282(34), 2007, s. 25000-25009.
41. Temoin S., Wu K.L., Wu V., Shoham M., Han Y.W., *Signal peptide of FadA adhesin from Fusobacterium nucleatum plays a novel structural role by modulating the filament's length and width*, *FEBS Letters*, 586, 2012, s. 1-6.
42. Han Y.W., Shi W., Huang G.T., Kinder Haake S., Park N.H., Kuramitsu H., Genco R.J., *Interactions between periodontal bacteria and human oral epithelial cells: Fusobacterium nucleatum adheres to and invades epithelial cells*, *Infection and Immunity*, 68, 2000, s. 3140-3146.
43. Chaushu S., Wilensky A., Gur C., Shapira L., Elboim M., Halftek G., Polak D., Achdout H., Bachrach G., Mandelboim O., *Direct recognition of Fusobacterium nucleatum by the NK cell natural cytotoxicity receptor NKp46 aggravates periodontal disease*, *PLOS Pathogens*, 8, 2012, s. 1002601.
44. Rubinstein M.R., Wang X., Liu W., Hao Y., Cai G., Han Y.W., *Fusobacterium nucleatum promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ $\beta$ -catenin signaling via its FadA adhesin*, *Cell Host Microbe*, 14, 2013, s. 195-206.

## ***Fusobacterium nucleatum* jako bakteria symbiotyczna, oportunistyczna i onkogenna**

### Streszczenie

*Fusobacterium nucleatum* to Gram-ujemna, beztlenowa bakteria będąca składnikiem mikroflory jamy ustnej i przewodu pokarmowego człowieka. *F. nucleatum* ewoluowała w ścisłym związku nie tylko z komórkami i tkankami gospodarza, ale także z innymi składnikami mikrobioty i odgrywa integralną i korzystną rolę zarówno w utrzymywaniu zdrowia, jak i rozwijaniu się różnych chorób. *F. nucleatum* stanowi rzadką przyczynę bakteriemii, ponieważ roczna zachorowalność wynosi 0,22-0,34 przypadków na 100 tys. osób. Jednak – jako bakteria patogenna – zaangażowana jest w szerokie spektrum chorób. Są to głównie: zaburzenia żołądkowo-jelitowe (nowotwory jelita i odbytu, nieswoiste zapalenia jelit, zapalenie wyrostka robaczkowego), choroby sercowo-naczyniowe, reumatoidalne zapalenie stawów, infekcje dróg oddechowych, zespół Lemierre'a, choroba Alzheimera oraz wpływ na niekorzystny przebieg ciąży (zapalenie błon płodowych, przedwczesny poród, urodzenie martwego płodu, posocznica noworodkowa, stan przedrzucawkowy). Czynniki ryzyka dla rozwoju bakteriemii *F. nucleatum* obejmują nowotwory złośliwe, podeszły wiek, nadużywanie alkoholu, immunosupresję i dializy. Infekcje są często nabywane w szpitalu. Śmiertelność w przypadku bakteriemii *F. nucleatum* może osiągnąć 10%.

Poszerzanie wiedzy o *F. nucleatum* w kierunku ich mutualistycznego i patogennego sposobu życia oraz rozbieżności w obydwu systemach funkcjonowania drobnoustrojów można wykorzystać do diagnostyki, w celach profilaktycznych i terapeutycznych.

Słowa kluczowe: fusobacterie, *Fusobacterium nucleatum*, infekcje zapalne, mutualizm, rak jelita grubego

## ***Fusobacterium nucleatum* as the symbiotic, opportunistic and oncogenic bacterium**

### Abstract

*Fusobacterium nucleatum* is a Gram-negative, anaerobe, that is a component of the microflora of the oral cavity and the human gastrointestinal tract. *F. nucleatum* has evolved in close association not only with the host's cells and tissues, but also with other components of the human microbiota, and plays an integral and beneficial role in both health maintenance and the progression of various diseases. *F. nucleatum* is a rare cause of bacteremia, as the annual incidence is 0.22-0.34 cases per 100,000 people of the population. However, as a pathogenic bacterium, it is involved in a wide spectrum of diseases. These are mainly: gastrointestinal disorders (bowel and rectal cancer, inflammatory bowel disease, appendicitis), cardiovascular disease, rheumatoid arthritis, respiratory infections, Lemierre's syndrome, Alzheimer's disease and adverse pregnancy outcomes (fetal membranes, premature birth, stillbirth, neonatal sepsis, pre-eclampsia). Risk factors for the development of *F. nucleatum* bacteraemia include malignancies, old age, alcohol abuse, immunosuppression, and dialysis. Infections are often acquired in the hospital. Mortality from *F. nucleatum* bacteraemia can be as high as 10%.

Expanding knowledge about *F. nucleatum* both towards its mutualistic and pathogenic way of life and the discrepancies in both systems of the microorganism's functioning can be used for diagnostics, preventive and therapeutic purposes.

Keywords: fusobacteria, *Fusobacterium nucleatum*, inflammatory infections, mutualism, colorectal cancer

## **Rola handlowych olejków eterycznych i ekstraktów z mięty pieprzowej w kontrolowaniu rozwoju glukuronidazo-dodatniego izolatu *E. coli* 48**

### **1. Wprowadzenie**

Wzrost lekooporności wśród mikroorganizmów oraz obecne trendy na stosowanie środków konserwujących naturalnego pochodzenia spowodowały zwiększenie zainteresowania potencjalnymi preparatami biobójczymi takimi jak olejki eteryczne i ekstrakty roślinne. Preparaty te cechują się z reguły niską szkodliwością dla człowieka, mogą wpływać pozytywnie na cechy sensoryczne produktu finalnego, a ich zastosowanie w postaci dodatku do żywności jest społecznie akceptowalne. Mogą być aplikowane zarówno jako naturalne dodatki konserwujące, jak i dezynfekujące w celu kontrolowania rozwoju niepożądanych bakterii w przemyśle spożywczym.

Olejek z mięty pieprzowej jest wykorzystywany w przemyśle ze względu na właściwości biologiczne, lecznicze oraz walory zapachowe. Otrzymuje się go na drodze destylacji z parą wodną, a zawartość olejku w surowcu wynosi 1,0-3,5% [1]. Wiele publikacji w dostępnej światowej literaturze donosi, że olejek z mięty pieprzowej działa przeciwdrobnoustrojowo. Işcan i in. [2] podają, że szczególnie wpływ na hamowanie wzrostu mają główne składniki olejku, tj. mentol i menton. Ze względu na zmienny skład olejków, ich aktywność biologiczna jest silnie zróżnicowana.

W dostępnej literaturze wykazano wpływ olejku z mięty pieprzowej na inhibicję wzrostu *E. coli*, gdyż strefy zahamowania wzrostu wynosiły 9 mm. Głównymi składnikami olejku były: mentol (40,7%) oraz menton (23,4%) [3]. W innych badaniach oceniono także skład chemiczny i właściwości przeciwdrobnoustrojowe olejku oraz ekstraktu z mięty pieprzowej odmiany „Asia”. Wykazano, że olejek w stosunku do szczepu *E. coli* charakteryzował się właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi, natomiast ekstrakt otrzymany z odmiany tej samej rośliny nie posiadał takiej aktywności. Powodem mogą być różnice w składzie, zarówno jakościowym, jak i ilościowym, gdyż olejek eteryczny zawierał 40 składników, natomiast ekstrakt – 15, chociaż głównymi komponentami w obu testowanych próbach był mentol i izomentol [4]. W badaniach przeprowadzonych przez Irkina i in. [5] olejek z mięty pieprzowej wykazywał właściwości przeciwdrobnoustrojowe w stosunku do pięciu rodzajów bakterii, w tym *E. coli*. Warto również zaznaczyć, że analizowany przez nich olejek tymiarkowy charakteryzował się silniejszym działaniem przeciwbakteryjnym w stosunku do tego samego

<sup>1</sup> 128580@student.uni.opole.pl, Koło Naukowe Biotechnologów, Wydział Przyrodniczo-Techniczny, Uniwersytet Opolski, www.uni.opole.pl.

<sup>2</sup> sgebczynska.029@gmail.com, Koło Naukowe Biotechnologów, Wydział Przyrodniczo-Techniczny, Uniwersytet Opolski, www.uni.opole.pl.

<sup>3</sup> emiliamaalkusz9@gmail.com, Koło Naukowe Biotechnologów, Wydział Przyrodniczo-Techniczny, Uniwersytet Opolski, www.uni.opole.pl.

<sup>4</sup> bartoszryl@gmail.com, Koło Naukowe Biotechnologów, Wydział Przyrodniczo-Techniczny, Uniwersytet Opolski, www.uni.opole.pl.

szczepu. W badaniach porównawczych dotyczących skuteczności olejku z mięty pieprzowej i wzorcowych antybiotyków przeciwko wybranym bakteriom Jeyakumar i in. [6] wykazali przeciwdrobnoustrojowe właściwości olejku w stosunku do wszystkich testowanych szczepów bakterii, w tym *E. coli*. Zauważono, że wraz ze wzrostem stężenia olejku zwiększały się strefy zahamowania wzrostu pałeczki okrężnicy. Przy jego najniższym (5%) stężeniu strefa zahamowania wzrostu szczepu wynosiła 9,33 mm ( $\pm 0,46$  mm), natomiast przy koncentracji 30% uległa zwiększeniu do 16,00 mm ( $\pm 0,81$  mm).

W badaniach przeprowadzonych przez Zaidi i in. [7] stwierdzono aktywność przeciwdrobnoustrojową olejku z mięty pieprzowej wobec szeregu bakterii, tj.: *Acinetobacter* spp., *Klebsiella* spp. i *S. aureus*. Natomiast szczep *E. coli* wykazywał oporność względem tego preparatu. W kolejnej publikacji – Selim [8] zaobserwował działanie tegoż olejku w stosunku do *E. coli* O157:H7. Różnice w aktywności biobójczej mogły wynikać zarówno ze zróżnicowanej wrażliwości pałeczek, jak i składu chemicznego olejków miętowych. Zróżnicowanie ilościowo-jakościowe dotyczy zarówno głównych aktywnych komponentów, jak i pozostałych związków chemicznych (tab. 1).

Tabela 1. Porównanie składu olejków miętowych

Związki chemiczne:	Skład chemiczny olejków miętowych [w proc.] wg danych literaturowych				
	Marwa i in. [9]	Saharkhiz i in. [10]	Rosato i in. [11]	Kałwa i in. [12]	Michalski i Zielińska [13]
$\alpha$ -tujen	0,31	-	-	-	-
$\alpha$ -pinen	0,32	0,32	0,73	-	-
Werbenon	0,02	-	-	-	-
Sabinen	1,38	0,26	0,22	-	-
$\beta$ -pinen	0,53	0,58	0,72	-	-
Mircen	-	-	0,40	-	-
$\alpha$ -felandren	0,01	-	-	-	-
P-cymen	0,03	-	-	-	-
Limonen	3,01	-	1,85	-	-
1,8-cyneol	6,06	6,69	0,20	-	3,70
Wodzian cis-sabinenu	0,24	0,50	-	-	-
Linalol	0,05	-	0,17	-	-
Chryzantenon	0,42	-	-	-	-
Izopulegol	-	-	1,35	-	-
Menton	7,42	2,45	9,48	20,00	45,00
Mentofuran	13,18	11,18	-	-	-
Izomenton	-	-	8,36	-	6,70
Neomentol	4,79	2,79	-	-	-
Mentol	46,32	53,28	67,98	>50,00	Do 80,00
Izomentol	-	-	-	-	28,70
Terpinen-4-ol	0,04	-	-	-	-
$\alpha$ -terpineol	0,03	-	0,46	-	-

Karwon	1,02	-	-	-	-
Pulegon	-	-	0,40	-	-
Piperyton	-	-	0,85	-	1,70
Octan neomentylu	0,43	0,65	-	-	-
Octan mentylu	12,10	15,10	2,37	-	5,00
Octan izomentylu	0,82	0,61	-	-	-
Octan $\alpha$ -terpinyłu	0,03	-	-	-	-
B-burbonen	0,37	0,37	0,23	-	-
$\alpha$ -gurjunen	0,03	-	-	-	-
$\beta$ -farnezen	-	0,30	-	-	-
$\beta$ -kariofilen	0,55	2,06	0,58	-	2,80
$\alpha$ -humulen	0,01	-	-	-	-
Germakren	-	2,01	0,69	-	2,70
Bicyklogermaken	-	0,22	-	-	-

Źródło: opracowanie własne na podstawie [9-13]

Celem pracy było porównanie wrażliwości lekoopornego izolatu *Escherichia coli* 48 na handlowe olejki eteryczne i ekstrakty z mięty pieprzowej oraz analiza ilościowo-jakościowa najaktywniejszego z badanych olejków eterycznych.

## 2. Materiały i metody

Materiał do badań stanowiły pałeczki *E. coli* 48 wyizolowane z linii technologicznej produkcji soków jednodniowych na podłożu ENDO (BTL, Polska). Obecność glukuronidazy oceniono w podłożu chromogennym TBX (ang. *Tryptone Bile X-Glucuronide* – BTL, Polska) inkubowanym w temperaturze 44°C przez 24 godziny. Niebieskozielone zabarwienie kolonii świadczyło o obecności enzymu glukuronidazy.

Następnie metodą dyfuzyjno-krążkową Kirby-Bauera [14] w podłożu Muellera-Hinton (Biomaxima, Polska) oceniono lekowrażliwość izolatu. Do oceny wrażliwości na antybiotyki zastosowano 24-godzinne hodowle, które inkubowano w 37°C na podłożu tryptozowo-sojowym (TSA, ang. *Trypticase Soy Agar* – BTL, Polska). Komórki bakterii zawieszano w roztworze PBS (ang. *Phosphate-Buffered Saline*, 0,8 dm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O; 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), uzyskując inokulum o gęstości optycznej  $\zeta=2$  przy długości fali 550 nm. Zastosowano krążki firmy BTL (Polska) wysycane antybiotykami z grup: penicylin – ampicyliną (AM 10  $\mu$ g), aminoglikozydów – gentamycyną (CN 10  $\mu$ g), fenikoli – chloramfenikolem (C 30  $\mu$ g), tetracyklin – tetracykliną (TE 30  $\mu$ g) oraz sulfonamidów – mieszaniną sulfametoksazolu i trimetoprimu (SXT 25  $\mu$ g). Każdy krążek delikatnie dociskano, zapewniając równomierny kontakt z podłożem i inkubowano w warunkach tlenowych 18 godzin, w temperaturze 35°C ( $\pm 2^\circ$ C). Następnie mierzono wielkość całkowitej strefy zahamowania wzrostu zasadniczego bakterii (wliczając średnicę krążka) i wynik podawano w [mm]. Profil oporności izolatów ustalano na podstawie rekomendacji EUCAST 2020 (ang. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) [15]. Za wielooporność izolatu na antybiotyki uznano oporność na przynajmniej trzy substancje należące do różnych grup terapeutycznych.

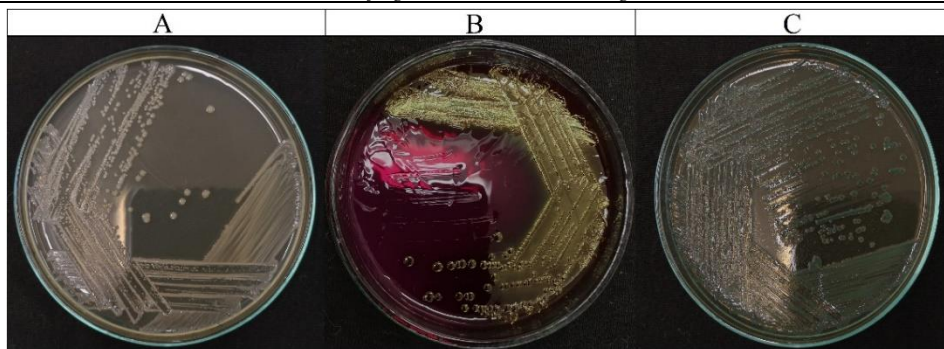
Równoległe metodą dyfuzyjną płytkowo-cylinderkową oceniano wrażliwość izolatu na komercyjne olejki eteryczne i ekstrakty z mięty pieprzowej o stężeniach :0,5%; 1,0%; 1,5%; 2,0%; 2,5%; 3,0% i 4,0% oraz olejek tymiankowy o stężeniach 0,5%; 1,0%; 1,5% i 2,0%. Roztwory olejków i ekstraktów sporządzano w wodzie z Tween 80 (BTL, Polska). W badaniach wykorzystywano handlowe olejki miętowe firmy Aromatika (A – olejek z mięty pieprzowej), VeraNord (B – olejek z mięty pieprzowej), Avicenna-Oil (C – olejek miętowy), Semifarm (D – olejek miętowy), Dr Beta (E – olejek z mięty pieprzowej) i ETJA (F – olejek miętowy) oraz dwa ekstrakty z mięty pieprzowej uzyskane metodą Soxhleta – ekstrakt z ogrodowej mięty pieprzowej (G) i ekstrakt z mięty z Maroka (H). Kontrolę względną stanowiła woda z Tween 80, a kontrolę bezwzględną olejek tymiankowy firmy ETJA (T). Strefy zahamowania wzrostu podawano w [mm]. Zahamowanie wzrostu w strefie  $\geq 10$  mm potraktowano jako wystąpienie efektu bakteriobójczego. Wszystkie oznaczenia wykonywano w czterech powtórzeniach.

Analizę GC-MS próbek badanego olejku miętowego przeprowadzono za pomocą chromatografu gazowego HP 689 sprzężonego ze spektrometrem masowym HP 5973A firmy Hewlett-Packard. Do badań zastosowano niepolarną kolumnę kapilarną HP-5MS (5% difenylu, 95% dimetylopolysiloksanu) o długości 30 m, średnicy wewnętrznej 0,32 mm i.d. oraz o grubości filmu 0,25  $\mu\text{m}$ . Stosowanym gazem nośnym był hel, a jego przepływ wynosił 1,5 ml/min. Analizy wykonywano w zakresie temperatur 60-280°C, przy szybkości grzania 100°C/min oraz izotermie wynoszącej 20 minut dla maksymalnej temperatury. Ponadto wykorzystywano dozownik typu on-column, na który dozowano próbki o objętości 1  $\mu\text{l}$ .

### 3. Wyniki

Badany izolat *E. coli* 48 na podłożu podstawowym (agar odżywczy) tworzył drobne kremowobiałe kolonie (rys. 1A). Natomiast na podłożu wybiórczym ENDO, służącym do wykrywania i różnicowania bakterii z grupy *coli* i *E. coli* z różnych materiałów, wykazywał wzrost w postaci charakterystycznych, zielonozłotych kolonii z metalicznym połyskiem (rys. 1B). Zabarwienie to związane jest z intensywnym tworzeniem aldehydu octowego, który powstaje w wyniku wykorzystania laktozy przez bakterie. Wytworzony aldehyd przywraca fuksynę do pierwotnej postaci (w podłożu ENDO zostaje ona zredukowana siarczynem sodu do bezbarwnej leukozasady).

Wzrost izolatu *E. coli* 48 w podłożu chromogennym TBX – w postaci niebieskozielono zabarwionych kolonii – świadczył o obecności enzymu glukuronidazy (rys. 1C). Podłoże to zawiera kompleks BCIG (kwas 5-bromo-4-chloro-3-indolilo- $\beta$ -D-glukuronowy), który po wnikięciu do komórki ulega hydrolizie enzymatycznej pod wpływem glukuronidazy. Cukier jest wykorzystywany przez bakterie, natomiast chromogen kumuluje się wewnątrz komórki, nadając kolonom niebieskozielony kolor. Obecność bakteryjnej  $\beta$ -glukuronidazy w jelicie grubym powoduje powstawanie związków kancerogennych takich jak fenol lub indol, które są odpowiedzialne za tworzenie nowotworów jelita. Z tego względu ważna jest eliminacja zagrożeń związanych z zakażeniami wywołanymi glukuronidazo-dodatnimi pałeczkami *E. coli* [16].



Rysunek 1. Wzrost *E. coli* 48: A – na agarze odżywczym; B – na podłożu ENDO; C – na podłożu chromogennym TBX [opracowanie własne]

Metoda dyfuzyjno-krażkowa Kirby-Bauera oparta jest na dyfuzji antybiotyku zawartego w krążku do podłoża. Antybiotyk dyfunduje obwodowo, tworząc gradient stężeń. Największa jego koncentracja występuje przy brzegach krążka i maleje w miarę oddalania się od niego. Wielkość strefy zahamowania wzrostu bakterii jest wprost proporcjonalna do stopnia wrażliwości drobnoustroju na antybiotyk – im większa średnica zahamowania, tym bakteria jest bardziej na niego wrażliwa. W zależności od wielkości strefy – bakterie określa się jako wrażliwe lub oporne na podstawie przyjętych rekomendacji. Jest to metoda dobrze wystandaryzowana, powtarzalna, a także relatywnie tania.

Na podstawie danych EUCAST z 2020 roku, biorąc pod uwagę strefy przejaśnienia (zahamowania wzrostu), wyznaczono graniczne wartości oporności (R, ang. *Resistant*) i wrażliwości (S, ang. *Susceptible*) na testowane antybiotyki. Ponieważ badane leki należały do różnych grup: ampicylina (AM 10 µg) – do penicylin, gentamycyna (CN 10 µg) – do aminoglikozydów, tetracyklina (TE 30 µg) – do tetracyklin, chloramfenikol (C 30 µg) – do fenikoli, a mieszanina sulfametoksazolu i trimetoprimu (SXT 25 µg) do sulfonamidów, izolat *E. coli* 48 uznano za wielooporny (tab. 2).

Tabela 2. Lekooporność izolatu *E. coli* 48 na testowane antybiotyki

Antybiotyki	Ampicylina (AM 10µg)	Gentamycyna (CN 10 µg)	Tetracyklina (TE 30 µg)	Chloramfenikol (C 30 µg)	Sulfametoksazol i trimetoprim (SXT 25 µg)
Oporność/ wrażliwość	R	S	R	R	R
Strefa zahamowania wzrostu [w mm]	< 14	≥ 17	< 14	< 17	0

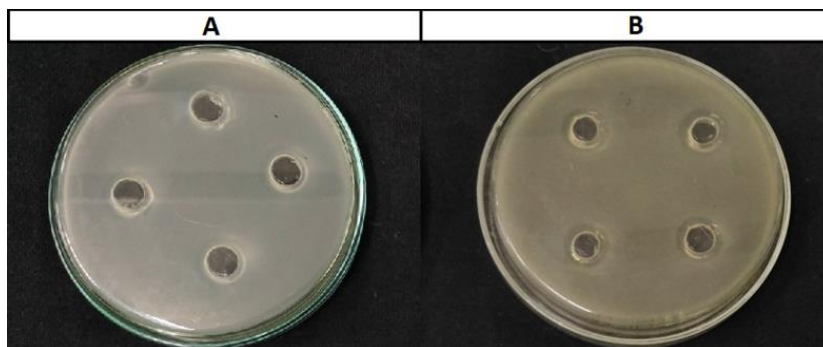
Źródło: opracowanie własne na podstawie [15]

Izolat ten był wrażliwy jedynie na olejek z mięty pieprzowej firmy VeraNord (B) o stężeniach 3,0% i 4,0%, a więc wyższych niż kontrolnie zastosowany olejek tymiankowy (T), który hamował jego rozwój już w stężeniach 1,5% i 2,0% (tab. 3., rys. 2A i 2B).

Tabela 3. Strefy zahamowania wzrostu *E. coli* 48 w obecności olejków eterycznych i ekstraktów z mięty pieprzowej oraz oleju tymiankowego [w mm]

Typ ekstraktu /stężenie [w proc.]	Strefy zahamowania wzrostu [w mm]									
	K	A	B	C	D	E	F	G	H	T
0,5	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a
1,0	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a
1,5	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	12,50 ±2,12
2,0	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	16,75 ±0,65
2,5	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	n/o
3,0	b/a	b/a	13,13 ±0,75	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	n/o
4,0	b/a	b/a	15,38 ±0,85	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	b/a	n/o

Źródło: opracowanie własne; oznaczenia: b/a – brak aktywności, n/o – nie oznaczano aktywności, K – próba kontrolna, A – olejek firmy Aromatika, B – olejek firmy VeraNord, C – olejek firmy Avicenna-Oil, D – olejek firmy Semifarm, E – olejek firmy Dr. Beta, F – olejek firmy ETJA, G – ekstrakt z ogrodowej mięty pieprzowej, H – ekstrakt z mięty z Maroka, T – olejek tymiankowy firmy ETJA; ±SD – odchylenie standardowe



Rysunek 2. Strefy zahamowania wzrostu *E. coli* 48: A – uzyskane przy zastosowaniu olejku z mięty pieprzowej firmy VeraNord w stężeniu 3%; B – przy zastosowaniu olejku tymiankowego firmy ETJA w stężeniu 2% [opracowanie własne]

Na podstawie analizy chromatograficznej wykazano, że głównymi składnikami olejku z mięty pieprzowej VeraNord był mentol (48,50%) i menton (21,70%), a dalej: izomenton (7,58%) i octan mentolu (5,20%). Pozostałe komponenty występowały w stężeniach poniżej 5% (tab. 4.). Chromatogram przedstawiono na rysunku 3.

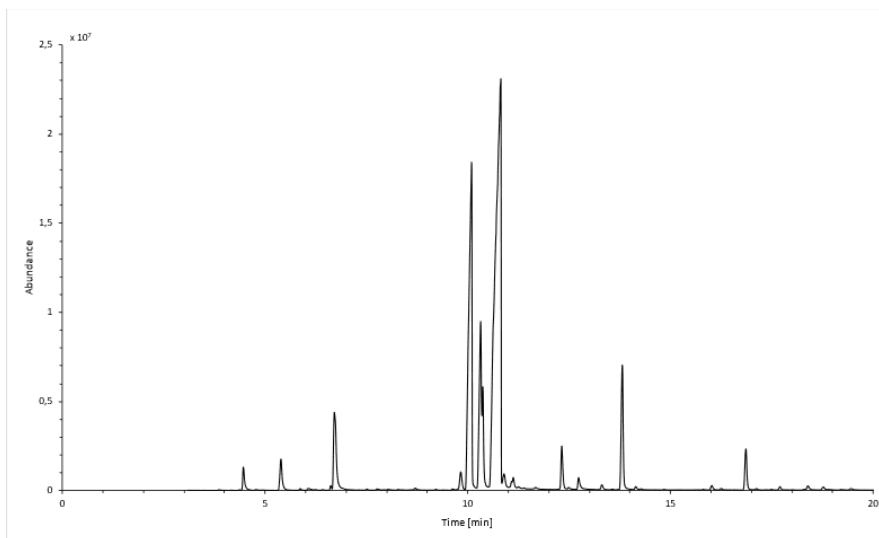
Tabela 4. Skład jakościowo-ilościowy olejku z mięty pieprzowej firmy VeraNord

Nazwa związku	Czas retencji [w min]	Powierzchnia [w proc.]	Indeks retencji
$\alpha$ -pinen	4,46	0,94	936
$\beta$ -pinen	5,38	1,51	978
limonen	6,70	4,72	1030
izopulegol	9,82	0,90	1145
menton	10,09	21,70	1150
izomenton	10,31	7,58	1159
neomentol	10,37	3,33	1165
mentol	10,81	48,50	1177
lewomentol	10,89	0,71	1178



$\alpha$ -terpineol	11,12	0,51	1190
pulegon	12,31	1,68	1234
piperyton	12,73	0,51	1254
octan izomentolu	13,30	0,23	1282
octan mentolu	13,81	5,20	1296
$\beta$ -burbonen	16,01	0,21	1384
kariofilen	16,85	1,78	1410

Źródło: opracowanie własne



Rysunek 3. Chromatogram olejku miętowego firmy VeraNord [opracowanie własne]

Składniki chemiczne olejku tymiankowego firmy ETJA można podzielić na 3 główne grupy pod względem ich struktury chemicznej: monoterpenoidy – najliczniejsze (stanowiące łącznie 60,98% całkowitego składu), monoterpeny (34,38%) i seskwiterpeny (4,64%). Do związków występujących w oleju w najwyższym stężeniu należały: monoterpenoid – tymol (45,75%  $\pm$ 0,18%) oraz monoterpen – limonen (15,15%  $\pm$ 0,18%) [17].

Tabela 5. Skład jakościowo-ilościowy olejku tymiankowego firmy ETJA

Nazwa związku	Stężenie [w proc.]	Indeks retencji
Monoterpeny		
tricyklen	0,17 $\pm$ 0,01	923
$\alpha$ -pinen	2,75 $\pm$ 0,09	936
kamfen	1,93 $\pm$ 0,07	950
$\beta$ -pinen	0,65 $\pm$ 0,02	978
$\beta$ -mircen	2,44 $\pm$ 0,03	989
$\alpha$ -felandren	0,87 $\pm$ 0,03	1004
$\alpha$ -terpinen	2,32 $\pm$ 0,10	1017
limonen	15,15 $\pm$ 0,18	1029
$\gamma$ -terpinen	8,10 $\pm$ 0,07	1060
Monoterpenoidy		

linalol	8,90 ±0,18	1099
1-terpineol	1,19 ±0,05	1137
borneol	3,07 ±0,09	1166
α-terpineol	1,14 ±0,09	1190
octan linalilu	0,93 ±0,06	1255
tymol	45,75 ±0,18	1290
Seskwiterpeny		
kariofilen	4,31 ±0,02	1419
α-kariofilen	0,33 ±0,03	1420

Źródło: opracowanie własne na podstawie [17]

#### 4. Dyskusja

Uzyskane wyniki wskazują na silne zróżnicowanie aktywności olejków eterycznych i ekstraktów pozyskanych z mięty pieprzowej względem wieloopornego, glukuronidazo-dodatniego szczepu *E. coli*. Wykazano aktywność jedynie jednego z sześciu badanych komercyjnych olejków miętowych, natomiast ekstrakty z ogrodowej mięty pieprzowej oraz mięty z Maroka nie powodowały zahamowania wzrostu badanego szczepu. Dostępne dane literaturowe również wskazują na silne zróżnicowanie w aktywności olejków miętowych wobec *E. coli*, co mogło wynikać zarówno z różnic we wrażliwości wykorzystanych szczepów, jak i składu chemicznego zastosowanych w badaniach ekstraktów [3-8]. Zróżnicowana aktywność może wynikać z odmiennych warunków klimatycznych i atmosferycznych, w jakich wzrastały rośliny wykorzystane do sporządzenia ekstraktów, sposobu i czasu przechowywania materiału roślinnego, czy metod ekstrakcji stosowanych przez poszczególnych producentów, co finalnie może przekładać się na istotne różnice w ich składzie jakościowo-ilościowym. Na fakt ten zwracają także uwagę inni autorzy badający aktywność ekstraktów roślinnych [18-20].

Zastosowany kontrolnie olejek tymiankowy firmy ETJA wykazał wyższą aktywność od jednego spośród badanych, aktywnego olejku miętowego firmy VeraNord. Uzyskane wyniki w tej kwestii są zgodne z dostępną literaturą światową [5]. Zawartość głównych komponentów olejku miętowego, który cechował się aktywnością względem badanego wieloopornego, glukuronidazo-dodatniego szczepu *E. coli* w stężeniach 3,0% i 4,0% – a więc mentolu (48,50%) i mentonu (21,70%) – była zbliżona do zawartości tych składników w ekstraktach miętowych otrzymanych przez innych autorów, którzy także wykazali wrażliwość *E. coli* na ekstrakty z mięty [3].

#### 5. Podsumowanie

Wieloopomy, glukuronidazo-dodatni szczep *E. coli* 48 wykazał wrażliwość jedynie na jeden z testowanych ekstraktów miętowych – komercyjny olejek eteryczny z mięty pieprzowej firmy VeraNord, aktywny w stężeniach 3,0% i 4,0%, co wskazuje na silne zróżnicowanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej i składu chemicznego preparatów handlowych, jak i ekstraktów uzyskanych metodą ekstrakcji ciągłej w aparacie Soxhleta. Świadczy to, że potencjalnie możliwa jest implementacja olejku z mięty pieprzowej firmy VeraNord, którego głównymi składnikami są mentol (48,50%) i menton (21,70%), izomenton (7,58%) oraz octan mentolu (5,20%) w roli „naturalnego konserwantu” poprawiającego przy tym cechy sensoryczne produktu finalnego. Ze względu na różnice w składzie dostępnych preparatów (a więc także ich aktywności przeciwbakteryjnej), w celu dobrania optymalnego preparatu cechującego się pożądanymi właściwościami

wskazane jest jednak wcześniejsze wnikliwe badanie składu chemicznego i aktywności hamującej wzrost *in vitro*.

## Podziękowania

Serdeczne podziękowania dla opiekunów Sekcji Mikrobiologii i Ekologii Koła Naukowego Biotechnologów Uniwersytetu Opolskiego: dr hab. inż. Teresy Krzyśko-Łupickiej (prof. UO) oraz dr hab. Moniki Sporek (prof. UO) za inspirację do prowadzonych badań i nadzór merytoryczny.

## Literatura

1. Kasprzykowska R., Kołodziejczyk A.S., Jankowska E., Stachowiak K., *Preparatyka i analiza związków naturalnych*, Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk 2014, s. 87-88.
2. İřcan G., Kirimer N., Kürkcüođlu M., Bařer H.C., Demirci F., *Antimicrobial screening of Mentha piperita essential oils*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(14), 2002, s. 3943-3946.
3. Jirovetz L., Buchbauer G., Bali S., Denkova Z., Slavchev A., Stoyanova A., Schmidt E., Geissler M., *Antimicrobial activities of essential oils of mint and peppermint as well as some of their main compounds*, Journal of Essential Oil Research, 21(4), 2011, s. 363-366.
4. Adaszyńska M., Swarczewicz M., Markowska-Szczupak A., Jadczyk D., *Skład chemiczny i właściwości przeciwdrobnoustrojowe olejku eterycznego i ekstraktu z mięty pieprzowej odmiany „Asia”*, Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2(87), 2013, s. 116-125.
5. Irkin R., Korukluođlu M., *Growth inhibition of pathogenic bacteria and some yeasts by selected essential oils and survival of L. monocytogenes and C. albicans in apple-carrot juice*, Foodborne Pathogens and Disease, 6(3), 2009, s. 387-394.
6. Jeyakumar E., Lawrence R., Pal T., *Comparative evaluation in the efficacy of peppermint (Mentha piperita) oil with standards antibiotics against selected bacterial pathogens*, Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2011, s. 253-257.
7. Zaidi S., Dahiya P., *In vitro antimicrobial activity, phytochemical analysis and total phenolic content of essential oil from Mentha spicata and Mentha piperita*, International Food Research Journal, 22(6), 2015, s. 2440-2445.
8. Selim S., *Antimicrobial activity of essential oils against vancomycin-resistant enterococci (VRE) and Escherichia coli O157:h7 in feta soft cheese and minced beef meat*, Brazilian Journal of Microbiology, 42, 2011, s. 187-196.
9. Marwa C., Fikri-Benbrahim K., Ou-Yahia D., Farah A., *African peppermint (Mentha piperita) from Morocco: chemical composition and antimicrobial properties of essential oil*, Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research, 8(3), 2017, s. 86-90.
10. Saharkhiz M.J., Motamedi M., Zomorodian K., Pakshir K., Miri R., Hemyari K., *Chemical composition, antifungal and antibiofilm activities of the essential oil of Mentha piperita L.*, ISRN Pharmacology, 2012.
11. Rosato A., Carocci A., Catalano A., Clodoveo M.L., Franchini C., Corbo F., Carbonara G. G., Carrieri A., Fracchiolla G., *Elucidation of the synergistic action of Mentha piperita essential oil with common antimicrobials*, PLOS ONE, 13(8), 2018.
12. Kałwa K., Wilczyński K., Olesińska K., *Wpływ warunków przechowywania suszonej mięty pieprzowej (Mentha piperita L.) na antyoksydacyjne właściwości otrzymanych naparów oraz zawartość i skład olejku eterycznego*, Acta Scientiarum Polonorum Technica Agraria, 16(1-2), 2017, s. 13-22.
13. Michalski J.A., Zielińska D., *Przegląd olejków eterycznych pozyskiwanych z roślin z rodziny jasnotowatych (Lamiaceae) i ich własności*, Polish Journal of Cosmetology, 18(1), 2015, s. 16-24.
13. Bauer A.W., Kirby W.M., Sherris J.C., Turck M., *Antibiotic susceptibility testing by a standardized disk method*, American Journal of Clinical Pathology, 45, 1966, s. 493-496.

14. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Breakpoints tables for interpretation of MICs and zones diameters*, Version 5.0, 2020.
15. Nowak A., Libudziś Z., *Karcynogenna aktywność mikroorganizmów jelitowych*, Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 6(61), 2008, s. 25-39.
16. Krzyśko-Lupicka T., Sokół S., Sporek M., Piekarska-Stachowiak A., Walkowiak-Lubczyk W., Sudoł A., *Effectiveness of the influence of selected essential oils on the growth of parasitic fusarium isolated from wheat kernels from Central Europe*, *Molecules*, 26(21), 2021, s. 6488.
17. Singh P., Pandey A.K., *Prospective of essential Oils of the genus Mentha as biopesticides. A Review*, *Frontiers in Plant Science*, 9, 2018, s. 1295.
18. Aćimović M., Pezo L., Zeremski T., Lončar B., Marjanović Jeromela A., Stanković Jeremic J., Cvetković M., Sikora V., Ignjatov M., *Weather conditions influence on hyssop essential oil quality*, *Processes*, 9(7), 2021, s. 1152.
19. Liao Z., Huang Q., Cheng Q., Khan S., Yu X., *Seasonal variation in chemical compositions of essential oils extracted from lavandin flowers in the Yun-Gui plateau of China*, *Molecules*, 26(18), 2021, 5639.

## Rola handlowych olejków eterycznych i ekstraktów z mięty pieprzowej w kontrolowaniu rozwoju glukuronidazo-dodatniego izolatu *E. coli* 48

### Streszczenie

Celem pracy było porównanie wrażliwości izolatu *Escherichia coli* 48 na handlowe olejki eteryczne i ekstrakty z mięty pieprzowej. Materiał do badań stanowił lekooporny, glukuronidazo-dodatni izolat *E. coli* 48 wyosobniony na podłożu ENDO z linii technologicznej produkcji soków jednodniowych. Obecność glukuronidazy oceniono w podłożu chromogennym TBX, a lekowrażliwość metodą dyfuzyjno-krażkową w podłożu Muellera-Hinton. Równolegle metodą dyfuzyjną płytkowo-cylinderkową oceniono wrażliwość izolatu na komercyjne olejki eteryczne i ekstrakty z mięty pieprzowej o stężeniach 0,5-4,0%. Roztwory olejków i ekstraktów sporządzono w wodzie z Tween 80. Kontrolę względną stanowiła woda z Tween 80, a kontrolę bezwzględną olejek tymiankowy firmy ETJA.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że glukuronidazo-dodatni izolat *E. coli* 48 był wielooporny. Wykazywał on wrażliwość jedynie na olejek z mięty pieprzowej firmy VeraNord o stężeniach 3,0% i 4,0%, a więc wyższe niż kontrolnie zastosowany olejek tymiankowy, który hamował rozwój tego izolatu w stężeniach 1,5% i 2,0%.

Słowa kluczowe: antybiotykkooporny, glukuronidazo-dodatni, *Escherichia coli*, *Mentha piperita*

## The role of commercial essential oils and peppermint extracts in controlling drug resistant *E. coli* 48 isolate

### Abstract

The aim of the presented study is to evaluate *Escherichia coli* 48 isolate's sensitivity to *Mentha piperita* commercial essential oils and extracts obtained by Soxhlet extraction method. Research material was drug-resistant, glucuronidase positive *E. coli* 48 strain isolated on ENDO medium from one-day juices processing equipment. The glucuronidase presence was evaluated on a TBX medium. Drug sensitivity was evaluated by disc-diffusion (Kirby-Bauer) method on Mueller-Hinton medium. The sensitivity of *E. coli* 48 strain was assessed by the plate-cylinder method, simultaneously to essential oils and peppermint extracts at concentrations of 05% and 4.0%. The solutions of essential oils and extracts were done in water with Tween 80 reagent.

Commercial mint essential oils and two extracts (from *Mentha piperita* and Moroccan mint) were used in the study. Relative control was water with Tween 80 reagent and absolute control – thyme essential oil produced by ETJA company.

In presented study glucuronidase positive *E. coli* 48 isolate was multi-drug resistant. The isolate was sensitive only to *Mentha piperita* essential oil from VeraNord company at concentrations of 3.0 and 4.0%. Therefore, the concentration was higher than the one used in absolute control (thyme essential oil) which had the ability to inhibit the growth of *E. coli* 48 isolate in concentration of 1.5% and 2.0%.

Keywords: drug resistant, glucuronidase positive, *Mentha piperita*, *Escherichia coli*

# Enzymy jako ważny cel leków przeciwgrzybiczych

## 1. Wstęp

Każdego roku infekcje grzybicze stają się przyczyną śmierci blisko 1,6 mln osób na świecie. Za większość z nich odpowiedzialne są szeroko rozpowszechnione gatunki oportunistyczne, z czego do najczęstszych zalicza się grzyby z rodzajów *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus* oraz *Pneumocystis* [1]. Najbardziej narażone na wystąpienie klinicznych objawów infekcji grzybiczych są osoby starsze i o obniżonej odporności (np. po leczeniu onkologicznym, po transplantacjach, z chorobami autoimmunologicznymi), a ich odsetek wzrasta z roku na rok [2].

Podobnie jak w przypadku bakterii – chorobotwórcze grzyby wykazują oporność na stosowane leki, a arsenał leków przeciwgrzybiczych jest nieporównywalnie mały w zestawieniu z ilością antybiotyków stosowanych w leczeniu zakażeń bakteryjnych. Wśród antymikotyków dysponujemy zaledwie pięcioma głównymi grupami (polieny, azole, echinokandyny, analogi pirymidyny, alliloaminy). W stosunku do każdej z wymienionych grup leków wśród patogenów grzybowych stwierdza się szczepy oporne, co stanowi narastający i coraz bardziej niepokojący problem, którego rozwiązaniem może być poszukiwanie nowych antybiotyków przeciwgrzybiczych [3, 4]. Opracowanie takich leków przysparza jednak ogromnych kłopotów, co jest związane z podobieństwem podstawowych szlaków metabolicznych komórek grzybowych i ludzkich (komórki eukariotyczne), stąd znalezienie nowych celów dla leków przeciwgrzybiczych wymaga rozpoznania specyficznych dla grzybów szlaków metabolicznych i uczestniczących w nich enzymów, których inhibicja byłaby śmiertelna dla grzybów, a jednocześnie neutralna dla komórek ludzkiego organizmu [3].

Badania krystalografii rentgenowskiej oraz badania przesiewowe bibliotek białek pozwalają na coraz sprawniejsze poznawanie różnic w strukturze enzymów będących celami leków przeciwgrzybiczych, co ułatwia wyszukiwanie potencjalnych inhibitorów skierowanych przeciwko wybranym enzymom oraz celowane modyfikacje istniejących środków przeciwgrzybiczych tak, aby wykazywały jak najlepszą selektywność i trwałość wiązania z konkretnymi białkami grzybowymi [5].

Celem niniejszej pracy jest podsumowanie najważniejszych informacji dotyczących stosowanych leków przeciwgrzybiczych o charakterze inhibitorów enzymów, zaangażowanych m.in. w syntezę komponentów ściany i błony komórkowej grzybów. Dodatkowo poniżej zostały przedstawione wybrane nowe cele leków przeciwgrzybiczych o charakterze enzymów i ich potencjalne inhibitory.

---

<sup>1</sup> s.chmielewska@uwb.edu.pl; Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych, Uniwersytet w Białymstoku, <https://uwb.edu.pl/>.

<sup>2</sup> urszula.czyzewska@uwb.edu.pl; Pracownia Cytobiochemii, Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii, Wydział Biologii, Uniwersytet w Białymstoku, <https://biologia.uwb.edu.pl/>.

<sup>3</sup> atyl@uwb.edu.pl; Pracownia Cytobiochemii, Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii, Wydział Biologii, Uniwersytet w Białymstoku, <https://biologia.uwb.edu.pl/>.

## 2. Powszechnie stosowane leki przeciwgrzybicze o charakterze inhibitorów enzymów i ich nowe analogi

Leki stosowane aktualnie w leczeniu grzybic powierzchniowych i ogólnoustrojowych obejmują przede wszystkim związki o charakterze inhibitorów dla enzymów zaangażowanych w syntezę komponentów ściany komórkowej grzybów (echinokandyny), błony komórkowej (hamowanie syntezy ergosterolu – azole, alliloaminy, morfoliny) oraz syntezę DNA i RNA (flucytozyna). Coraz częstsze przypadki oporności na te leki wymagają modyfikacji ich struktury chemicznej, co daje nadzieję na szybkie opracowanie skuteczniejszych i efektywniejszych związków o znanym mechanizmie działania i ograniczonej toksyczności [5, 6].

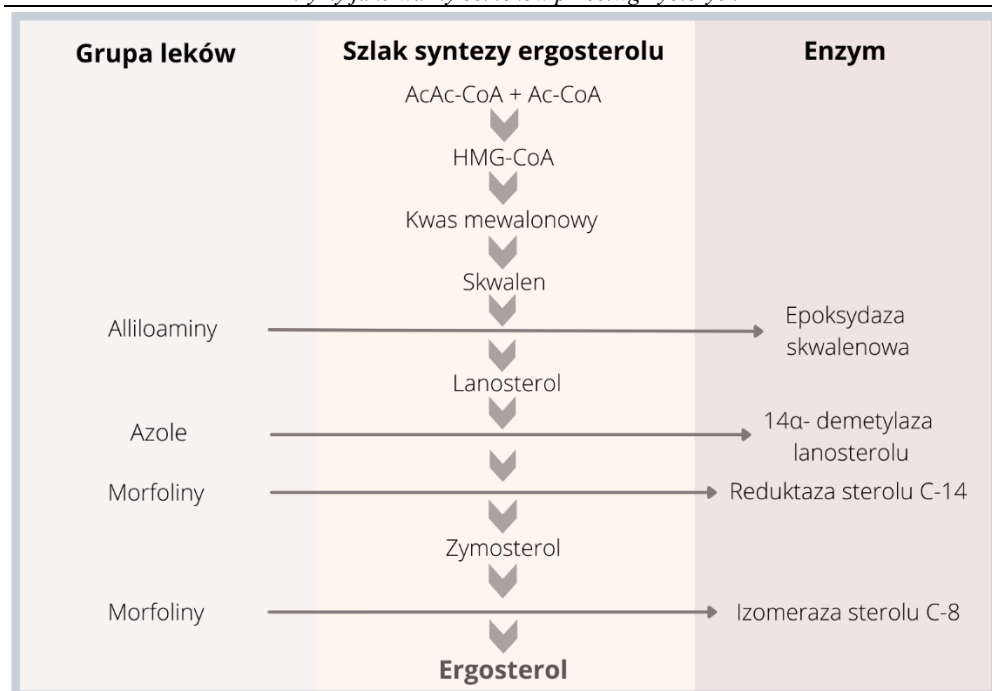
### 2.1. Leki hamujące biosyntezę ergosterolu

Błona komórkowa grzybów zawiera głównie białka, sterole, glicerofosfolipidy i sfingolipidy, które są kluczowe dla metabolizmu komórki, wymiany związków chemicznych pomiędzy komórką a środowiskiem, odbioru bodźców i szlaków przekazywania sygnałów, a co za tym idzie również patogenezę chorób [7].

Mewalonowy szlak biosyntezy steroli, mimo że występuje również w ludzkich komórkach, stanowi główny cel wielu środków przeciwgrzybiczych. Podstawowym sterolem błon komórkowych grzybów jest ergosterol, którego synteza różni się w poszczególnych etapach od głównego szlaku biosyntezy cholesterolu u ludzi. Do leków, które oddziałują na poszczególne etapy szlaku biosyntezy ergosterolu należą azole, alliloaminy i morfoliny [3, 8] (rys. 1).

Azole, stanowią jedną z najstarszych grup leków przeciwgrzybiczych. Ze względu na dobre efekty terapeutyczne i mniejszą toksyczność – w porównaniu do polienów (najstarszej grupy antymikotyków) – są bardzo powszechnie stosowane, szczególnie w zakażeniach wywołanych drożdżakami i grzybami z rodzaju *Aspergillus* [8, 9]. Azole są syntetycznymi związkami organicznymi zawierającymi jeden lub więcej pięcioczłonowych, heterocyklicznych pierścieni azolowych, z których każdy zawiera dwa (imidazole) lub trzy (triazole) atomy azotu (rys. 2). Aktywność przeciwgrzybiczą azoli opisano pierwszy raz w 1944 r. (bezimidazol), natomiast w 1958 r. wprowadzono na rynek chlorimidazol [10, 11]. Dynamiczny rozwój syntezy azoli i zwiększenie zakresu stosowania tych związków jako leków przypadły na lata 70. XX w. i trwają do dzisiaj [12].

Działanie azoli polega na inhibicji grzybowego enzymu 14 $\alpha$ -demetylasy lanosterolu (określanego jako CYP51, kodowanego przez *ERG11*) zależnego od cytochromu P450 3A, co zaburza pierwszy etap szeregu reakcji prowadzących do konwersji lanosterolu w ergosterol. Inhibicja wyżej wspomnianego enzymu prowadzi do akumulacji 14 $\alpha$ -metylosteroli oraz zmniejszenia ilości ergosterolu w błonie komórkowej grzyba, co skutkuje zaburzeniami właściwości błony komórkowej, a zwłaszcza zwiększoną jej przepuszczalnością, co bezpośrednio przekłada się na zahamowanie proliferacji patogenów grzybowych. Ponadto związki azolowe mogą hamować (zależne od cytochromu P450) enzymy łańcucha oddechowego zarówno u grzybów, jak i u ludzi, a interakcja ze ssaczymi enzymami zależnymi od cytochromu P450, obok możliwości hamowania syntezy cholesterolu, jest odpowiedzialna za występowanie skutków ubocznych po stosowaniu tej grupy leków. Inne efekty przeciwgrzybicze azoli obejmują toksyczną interakcję z fosfolipidami błony i hamowanie transformacji drożdżaków w formę strzępkową [9, 12]. Powszechnie stosowanie azoli wiąże się ze zjawiskiem narastającej oporności na te leki. Mechanizmy odpowiedzialne za kształtowanie lekooporności na azole u grzybów wynikają przede wszystkim z mutacji w genie *ERG11* [14].

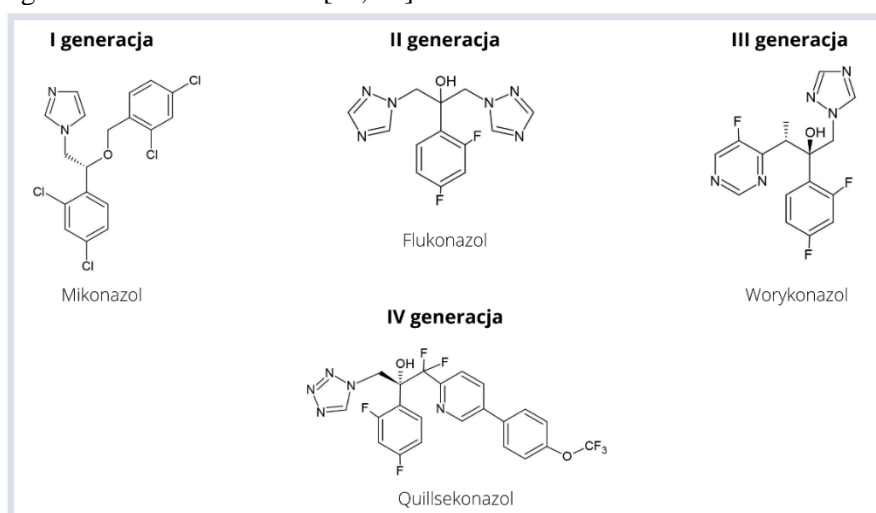


Rysunek 1. Leki hamujące poszczególne etapy biosyntezy ergosterolu poprzez oddziaływanie na wybrane enzymy, opracowanie własne na podstawie [13]

Wśród azoli obserwuje się największą liczbę kandydatów na nowe leki, które są często wprowadzane na rynek. Aktualnie w sprzedaży znajduje się około 40 preparatów zawierających związki azolowe [12]. Leki azolowe dzieli się aktualnie na cztery generacje (tab. 1). Generacja I, obejmująca najstarsze związki z tej grupy (klotrimazol, mikonazol, ekonazol), to leki, które zostały wprowadzone do obrotu jako powierzchniowe środki przeciwgrzybicze, a ich struktura opiera się na szkielecie imidazolu. Generacja II związków azolowych wykazała się zwiększonym bezpieczeństwem stosowania, szerszym spektrum działania i lepszą farmakokinetyką (w porównaniu z pierwszą generacją) dzięki kilku ważnym modyfikacjom. Generacja ta obejmuje takie związki jak ketokonazol, pochodną imidazolu, który został dopuszczony do obrotu w 1981 r. Był to pierwszy stosowany doustnie azol do leczenia grzybic układowych. W 2013 r. został jednak wycofany z leczenia ogólnoustrojowego ze względu na słabą selektywność działania, problemy z biodostępnością oraz stosunkowo wysoką hepatotoksyczność. Kolejnymi ważnymi lekami tej generacji były flukonazol oraz itraconazol – pierwsze triazole, zatwierdzone do użytku klinicznego na początku lat 90. XX w. [15]. Dalsze modyfikacje flukonazolu oraz itraconazolu doprowadziły do syntezy III generacji azoli wykazujących lepszą selektywność, szersze spektrum działania, lepszą rozpuszczalność i zwiększoną biodostępność w porównaniu do leków I i II generacji. Do azoli III generacji należą leki takie jak worykonazol (wprowadzony w 2002 r.) oraz posakonazol (wprowadzony w 2004 r.) [16].

Jednym z najnowszych azoli III generacji jest albakonazol, a na etapie badań klinicznych znajduje się jeszcze szereg związków tej generacji, takich jak genakonazol (III faza badań klinicznych), saperkonazol (II faza badań klinicznych) czy embekonazol

(I faza badań klinicznych) [12]. Wraz z postępem chemii medycznej i możliwościami modyfikacji związków chemicznych powstała IV generacja struktur azolowych wykazująca znacznie wyższą selektywność w stosunku do grzybowego białka CYP51, co osiągnięto poprzez zastąpienie pierścienia triazolowego pierścieniem tetrazolowym oraz modyfikacją łańcucha bocznego. Kilka związków określanych jako IV generacja azoli znajduje się obecnie na etapie badań klinicznych: quilsekonazol (I faza badań klinicznych), otesekonazol (III faza badań klinicznych) oraz VT-1598 (faza badań przedklinicznych). Co ważne, VT-1598 wykazuje dobre działanie przeciwko wielolekoopornemu gatunkowi *Candida auris* [12, 17].



Rysunek 2. Porównanie struktur chemicznych wybranych przedstawicieli azoli poszczególnych generacji; opracowanie własne

Tabela 1. Podział azoli na generacje i przykłady związków najczęściej stosowanych w leczeniu grzybic ze wskazaniem nowych przedstawicieli znajdujących się w różnych fazach badań klinicznych

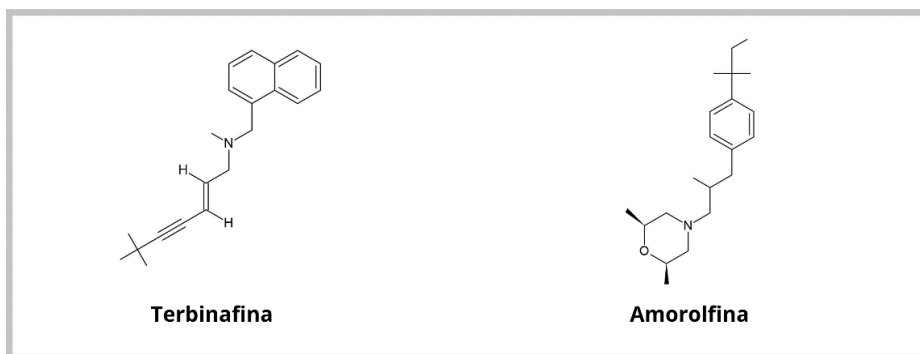
Generacja	Nazwa związku	Faza badań klinicznych
I	Mikonazol	zakończone, zatwierdzone do stosowania
	Klotrimazol	
	Ekonazol	
II	Ketokonazol	zakończone, zatwierdzone do stosowania
	Flukonazol	
	Itrakonazol	
III	Posakonazol	zakończone, zatwierdzone do stosowania
	Worykonazol	
	Izawukonazol	
	Albakonazol	
	Rawukonazol	III
	Genakonazol	
	Saperkonazol	
IV	Embekonazol	I
	Iodikonazol	III
	Quilsekonazol	I
	Otesekonazol	III
	VT-1598	badania przedkliniczne

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [12]



Inną grupą leków oddziałującą na enzymy związane z mewalonowym szlakiem syntezy steroidów są alliloaminy. Związki tej grupy zaburzają epoksydację skwalenu poprzez oddziaływanie z enzymem epoksydazą skwalenową, prowadząc do wewnątrzkomórkowej akumulacji skwalenu i jego prekursorów, co prowadzi do śmierci komórki. Leki zaliczane do tej grupy to terbinafina i naftyfina. Terbinafina jest najczęściej stosowanym lekiem z tej grupy; jako jedyna (poza zastosowaniem miejscowym) jest wykorzystywana w leczeniu ogólnoustrojowym (rys. 3). Jej synteza została opracowana na początku lat 80. ubiegłego stulecia, a na rynek farmaceutyczny weszła w 1991 r. [18, 19]. Związek ten wykazuje działanie grzybobójcze i grzybobójcze zarówno wobec drożdżaków, jak i dermatofitów. Terbinafina bardzo dobrze wchłania się po podaniu doustnym i efektywnie gromadzi się w warstwach rogowych naskórka, mieszkach włosowych, jak również dobrze przenika do płytek paznokciowych, w związku z czym jest szeroko stosowana w maściach przeciwko zakażeniom dermatofitowym, wywołanym przez gatunki takie jak *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, i *Epidermophyton spp.* Wykazuje słabe działanie w stosunku do pleśni, a w przypadku drożdżaków z rodzaju *Candida spp.* działa jedynie grzybobójczo [20].

Kolejną grupą związków chemicznych oddziałujących na enzymy szlaku mewalonowego są pochodne morfoliny, z których zastosowanie jako lek przeciwgrzybiczy znalazła amorolfina (fenylopropylopiperydyna) hamująca dwa etapy szlaku biosyntezy ergosterolu jako inhibitor reduktazy sterolu C-14 i izomerazy sterolu C-8, prowadząc do nagromadzenia igrysterolu i niedoboru ergosterolu, co w efekcie powoduje zaburzenia w funkcjonowaniu błony komórkowej, prowadząc do śmierci komórki grzyba [21, 22]. Amorolfina wykazuje działanie grzybobójcze i grzybobójcze wobec drożdżaków z rodzajów *Candida* i *Malassezia*, dermatofitów z rodzajów *Trichophyton* i *Microsporum* oraz pleśniaków z rodzajów *Alternaria* i *Scopulariopsis*. Niestety lek ten stosuje się tylko miejscowo, głównie w leczeniu grzybicy paznokci, gdyż po podaniu ogólnoustrojowym jest nieefektywny [23].



Rysunek 3. Wzory strukturalne najważniejszych związków z grupy alliloamin (terbinafina) oraz morfolin (amorolfina); opracowanie własne

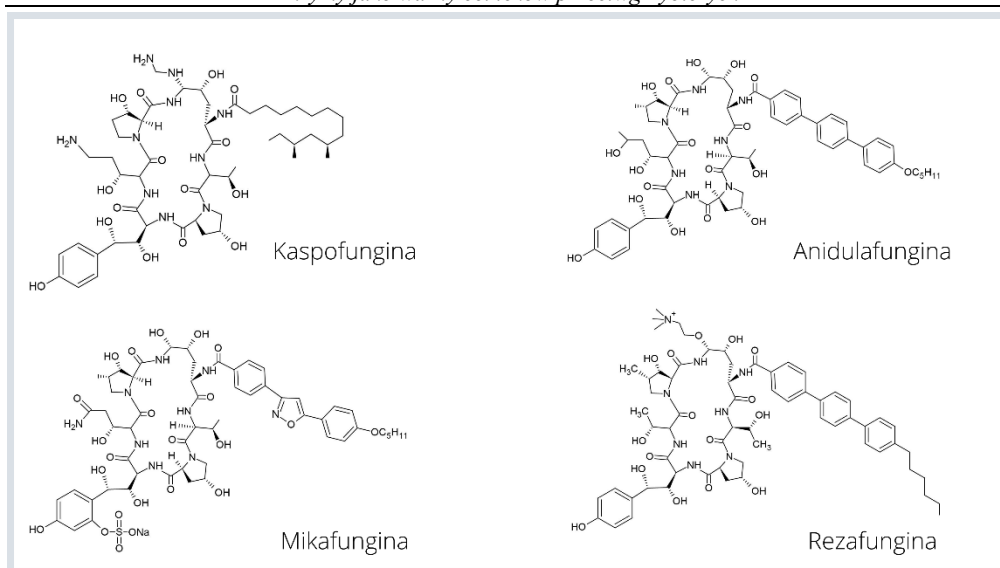
## 2.2. Leki hamujące syntezę elementów ściany komórkowej grzybów

Ściana komórkowa grzybów i jej składniki są bardzo dobrym celem dla leków przeciwgrzybiczych ze względu na to, że struktura ta nie ma odpowiednika w komórkach ssaków. Struktura ściany komórkowej grzybów obejmuje polisacharydy takie jak glu-

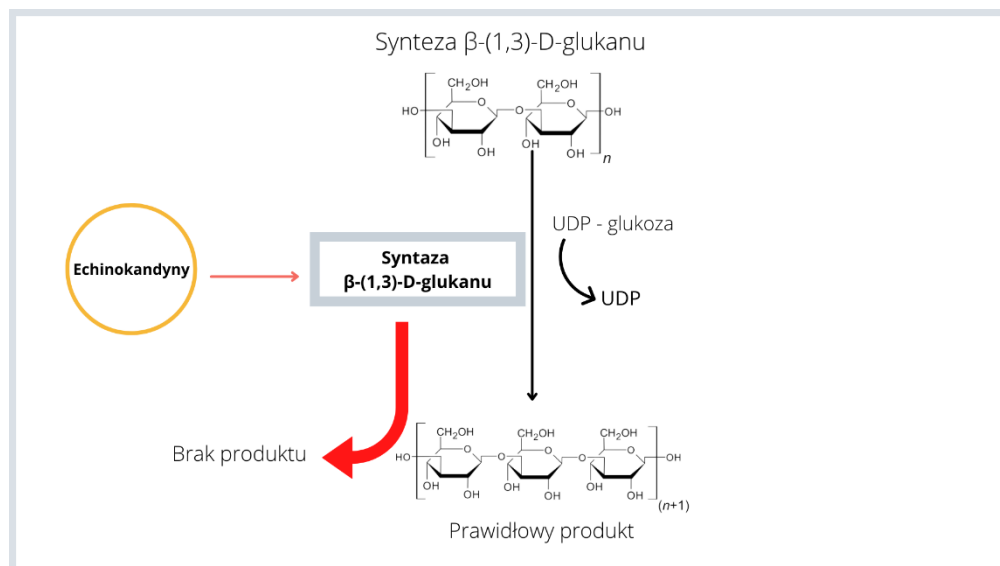
kany ( $\beta$ -(1,3)-D glukany,  $\beta$ -(1,4)-D glukany,  $\beta$ -(1,6)-D glukany,  $\alpha$ -glukany), chitynę, mannan oraz glikoproteiny, a proporcje tych składników różnią się w zależności od gatunku patogena [24, 25]. Glukany są bardzo ważnymi składnikami ściany komórkowej odpowiedzialnymi za jej wytrzymałość mechaniczną. Zablokowanie syntezy tych związków powoduje zaburzenia struktury ściany komórkowej, prowadząc w efekcie do lizy komórek grzyba. Jedyną grupą stosowanych leków przeciwgrzybiczych działających jako inhibitory syntezy glukanu są echinokandyny [26].

Te związki chemiczne, do których zaliczamy kaspofunginę, mikafunginę i anidulafunginę (rys. 4), swoje działanie opierają na hamowaniu syntazy  $\beta$ -(1,3)-D-glukanu (rys. 5), która jest wbudowanym w strukturę błony komórkowej enzymem niezbędnym w syntezie podstawowych polisacharydów ściany komórkowej grzybów z rodzajów *Candida* czy *Aspergillus*. Echinokandyny mają rdzeń złożony z cyklicznego heksapeptydu i są acylowane hydrofobowym łańcuchem bocznym przyłączonym do grupy  $\alpha$ -aminowej dihydroksyornityny. Ta reszta lipidowa jest wymagana do zakotwiczenia leku w błonie komórkowej, dlatego jest niezbędna do jego bioaktywności [27]. Echinokandyny stały się dobrą alternatywą dla azoli i polienów w leczeniu ciężkich zakażeń grzybiczych (wywoływanych w szczególności przez gatunki z rodzajów *Candida* i *Aspergillus*) ze względu na unikalny mechanizm działania i stosunkowo łagodne skutki uboczne w porównaniu z innymi lekami przeciwgrzybiczymi [28]. Echinokandyny podaje się pacjentom dożylnie, ponieważ są słabo wchłaniane w przewodzie pokarmowym. Nie mogą również przenikać do ośrodkowego układu nerwowego ani do oczu, dlatego nie są stosowane w leczeniu zapalenia wewnątrzgałkowego lub grzybiczego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych. W czasie ciąży należy unikać echinokandyn, ponieważ wykazują one działanie embriotoksyczne i teratogenne. Nie są również skuteczne w leczeniu zakażeń grzybiczych wywoływanych przez gatunki o ograniczonej zawartości  $\beta$ -(1,3)-D glukanu w ścianie komórkowej [29]. Lekooporność na echinokandyny wiąże się ze zwiększoną produkcją chityny, jak również mutacjami w katalitycznej podjednostce syntazy glukanu (FKS1), co obserwuje się u wielu gatunków *Candida* i w mniejszym stopniu u *Aspergillus* [30, 31].

Echinokandyny to grupa leków, której odkrycie sięga 1974 r., kiedy to po raz pierwszy scharakteryzowano związek o nazwie echinokandyna B, która wykazywała dobre właściwości przeciwgrzybicze, jednak działała także silnie hemolitycznie, co wykluczało ją z klinicznego zastosowania [27, 32]. Dalsze badania nad modyfikacjami syntetycznymi echinokandyn doprowadziły do powstania analogów, z których: kaspofungina w 2001 r., mikafungina w 2005 r., zaś anidulafungina w 2006 r. zostały zatwierdzone do wykorzystania jako leki przeciwgrzybicze [33, 34]. Najnowszym lekiem z tej grupy jest rezafungina (rys. 4), będąca analogiem anidulafunginy, znajdująca się obecnie w III fazie badań klinicznych, mająca zastosowanie u pacjentów z kandydemią i inwazyjną kandydozą [35, 36]. Związki z grupy echinokandyn, takie jak pneumokandyna A0 i B0, echinokandyna B i FR901379 są naturalnie syntetyzowane przez grzyby nitkowate. Kaspofungina, mykafungina, anidulafungina i rezafungina to półsyntetyczne cykliczne lipopeptydy o działaniu przeciwgrzybiczym [27]. Rezafungina jest pierwszym przedstawicielem II generacji klasy echinokandyn [35]. Wykazuje działanie przeciwko gatunkom z rodzajów *Candida*, *Aspergillus*, *Pneumocystis* oraz *Trichophyton*. Rezafungina jest również skuteczna przeciwko izolatom, u których stwierdzono oporność na inne echinokandyny lub azole (niektóre szczepy *C. auris*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*) [32, 37].



Rysunek 4. Struktury chemiczne echinokandyn I generacji (kaspofungina, mikafungina, anidulafungina) i II generacji (rezafungina); opracowanie własne



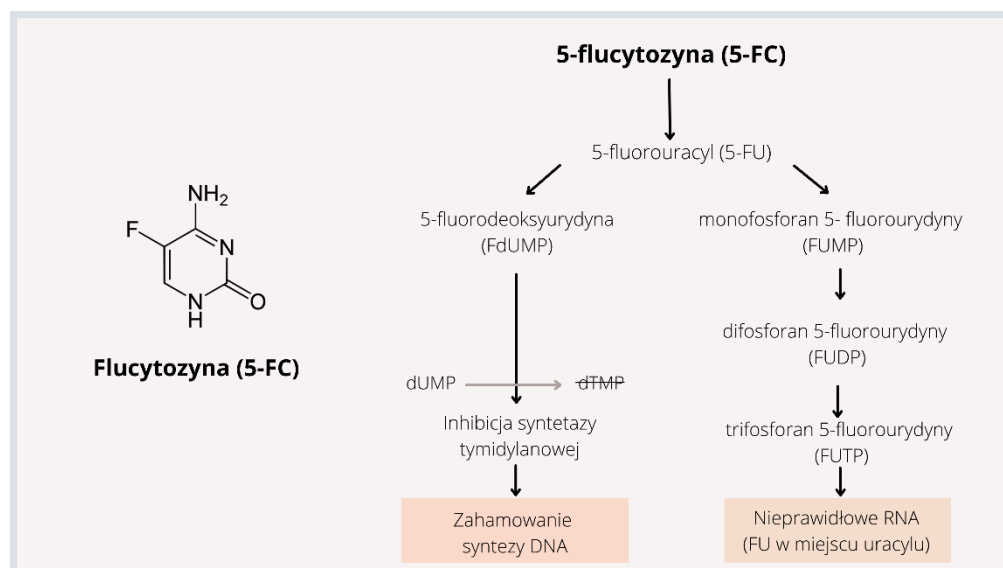
Rysunek 5. Mechanizm działania echinokandyn; opracowanie własne na podstawie [26, 38]

### 2.3. Inhibitory syntezy DNA

Flucytozyna jest syntetycznym fluorowanym analogiem pirymidyny, który został opracowany już w latach 50. XX w. jako lek przeciwnowotworowy. Jednak nie wykazywał oczekiwanej aktywności, za to okazał się związkiem o działaniu przeciwgrzybiczym [39]. Flucytozyna, dokładniej 5-fluorocytozyna (5-FC), transportowana jest do komórek grzybiczych za pomocą enzymu permeazy cytozyny i przekształcana w cytoplazmie przez deaminazę cytozyny do 5-fluorouracylu (5-FU), który jest antymetabolitem uracylu. 5-fluorouracyl jest fosforylowany i włączany do RNA, gdzie prowadzi

do zaburzeń w ekspresji informacji genetycznej. Dodatkowo ufosforylowany 5-FU może być wbudowywany do deoksynukleozydu, a następnie hamować enzym syntetazę tymidylanową, jednocześnie powodując zakłócenia syntezy DNA (rys. 6). Flucytozyna jest nietoksyczna dla komórek ssaków poprzez brak aktywności lub bardzo niską aktywność enzymu deaminazy cytozyny [39, 40]. Spektrum działania flucytozyny obejmuje drożdżaki i grzyby nitkowate [9, 41]. Notowana oporność na flucytozynę wynika z mutacji w jednym lub kilku regionach genomu kodujących enzymy niezbędne do włączenia tego związku do metabolizmu. Wśród mechanizmów oporności stwierdza się również ograniczenie wchłaniania leku do komórki grzyba lub aktywację syntezy prawidłowych nukleotydów konkurujących z flucytozyną i jej metabolitami [42, 43].

Flucytozyna rzadko kiedy jest podawana jako jedyny lek, zazwyczaj jest wykorzystywana w terapii skojarzonej, np. z amfoterycyną B. Kombinacja tych dwóch leków wykazuje synergistyczne działanie grzybobójcze przeciwko gatunkom z rodzaju *Candida* czy *Cryptococcus*, dając dobre efekty w przypadku infekcji ogólnoustrojowych, szczególnie kandydemii. Flucytozynę często kojarzy się w leczeniu klinicznym również z azolami [9, 44].



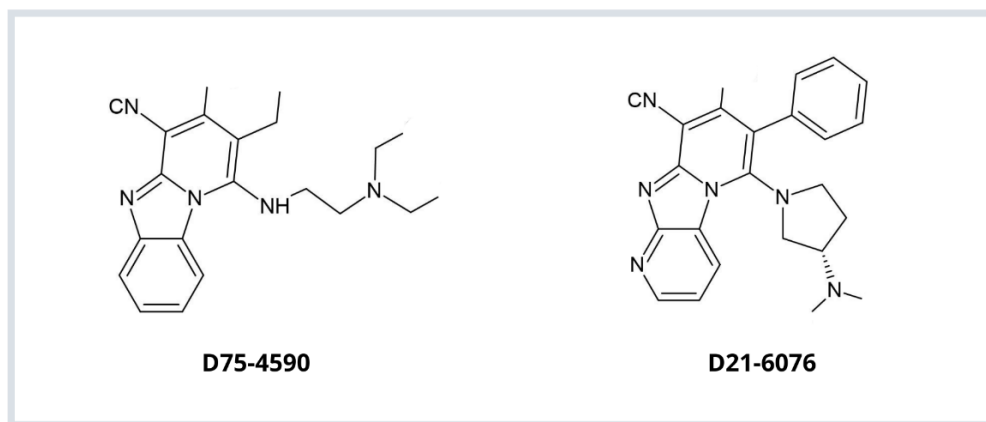
Rysunek 6. Mechanizm działania flucytozyny w komórkach grzybów; opracowanie własne na podstawie [40]

### 3. Nowe cele dla leków przeciwgrzybiczych

Poszukiwanie nowych celów dla leków przeciwgrzybiczych jest utrudnione ze względu na podobieństwa metaboliczne komórek grzybowych i ludzkich, jednak jest niezbędne w dobie narastającej oporności na podstawowe leki przeciwgrzybicze i pojawiające się gatunki wielolekooporne, takie jak np. *Candida auris* czy *Candida glabrata*. Enzymy zaangażowane w syntezę specyficznych cukrów, aminokwasów, puryn i pirymidyn, jak również biorące udział w procesie translacji, to tylko niektóre z wielu przykładów potencjalnych celów, które mogą stanowić podstawę do opracowywania nowych leków skierowanych przeciwko chorobotwórczym grzybom [5, 45, 46] (tab. 2).

### 3.1. Enzymy zaangażowane w syntezę specyficznych cukrów i ich pochodnych

Ze względu na różne typy glukanów występujących w ścianie komórkowej poszczególnych gatunków grzybów – niektóre z nich wykazują naturalną oporność na echinokandyny. Stąd też kolejnym potencjalnym celem dla leków przeciwgrzybiczych stała się syntaza  $\beta$ -(1,6)-D-glukanu. Zidentyfikowano związek chemiczny – pochodną pirydobenzimidazolu (D75-4590) o właściwościach inhibitora biosyntezy  $\beta$ -(1,6)-D-glukanu, który wykazał znaczące działanie wobec *Candida albicans*. Modyfikacje związku D75-4590 doprowadziły do nieznacznego poszerzenia spektrum działania o *C. glabrata* (pochodna określana jako D21-6076). Nie opisano niestety, jak dotąd, dalszych skutecznych modyfikacji tych związków [47] (rys. 7).

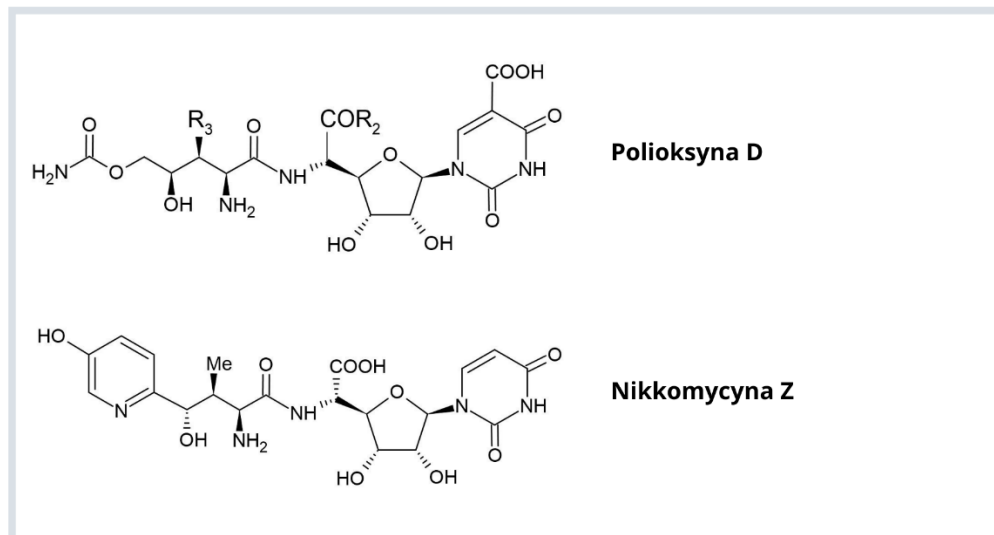


Rysunek 7. Pochodne pirydobenzimidazolu – potencjalne inhibitory syntazy  $\beta$ -(1,6)-D-glukanu; opracowanie własne

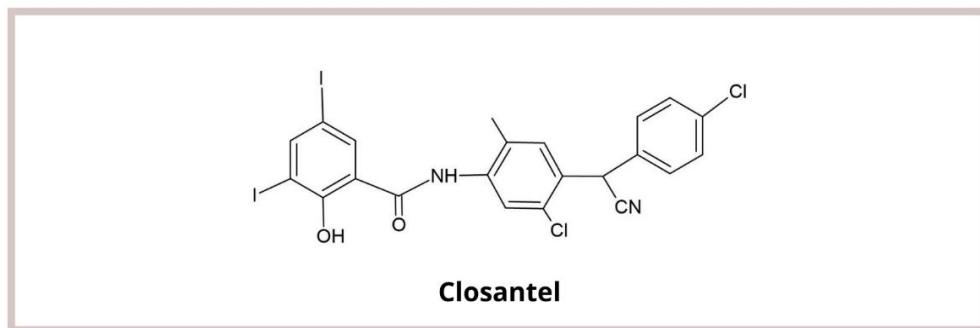
Chityna, polisacharyd będący polimerem N-acetyloglukozaminy, to istotny składnik ściany komórkowej grzybów, za którego biosyntezę odpowiada enzym syntaza chityny [24]. Obiecującymi inhibitorami tego enzymu okazały się do tej pory dwa związki: polioksyna D oraz nikkomycyna Z [48] (rys. 8). Większość badań skupiło się na nikkomycynie Z, która wykazuje lepszą aktywność przeciwgrzybiczą i szersze spektrum działania, jednak badania nad tym związkiem zostały zawieszono po pierwszej fazie klinicznej. Stało się to prawdopodobnie ze względu na niezadowalającą efektywność *in vivo*. Nikkomycyna Z i polioksyna D to oparte na urydynie metabolity wtórne pochodzące od *Streptomyces tendae*, wykazujące podobieństwo strukturalne do substratu syntazy chityny, UDP-N-acetyloglukozaminy. Związki te wykazują działanie fungistatyczne m.in. wobec grzybów z rodzajów *Coccidioides*, *Histoplasma* czy *Blastomyces* [5, 49].

Innym nowym celem środków przeciwgrzybiczych może okazać się szlak syntezy trehalozy. Trehaloza jest nieredukującym disacharydem, który nie jest syntetyzowany w organizmach zwierzęcych. U większości grzybów trehaloza jest syntetyzowana w dwuetapowej reakcji enzymatycznej katalizowanej przez syntazę trehalozo-6-fosforanu i fosfatazę trehalozo-6-fosforanu [50]. Badania nad tymi enzymami i ich potencjalnymi inhibitorami nie dały jak na razie większych efektów w postaci opisanego specyficznych inhibitorów. Jednak analizy przesiewowe związków chemicznych wskazały, że lek

closantel (chlorowcowany salicyloanilid), który jest stosowany u zwierząt w leczeniu chorób pasożytniczych, znacząco hamuje szlak syntezy trehalozy (rys. 9). Closantel w badaniach *in vitro* wykazał efekt fungistatyczny wobec grzybów z rodzaju *Cryptococcus* [51]. Dalsze badania nad modyfikacjami chemicznymi closantelu mogą mieć znaczenie w projektowaniu leków przeciwgrzybiczych działających na zasadzie hamowania syntezy trehalozy.



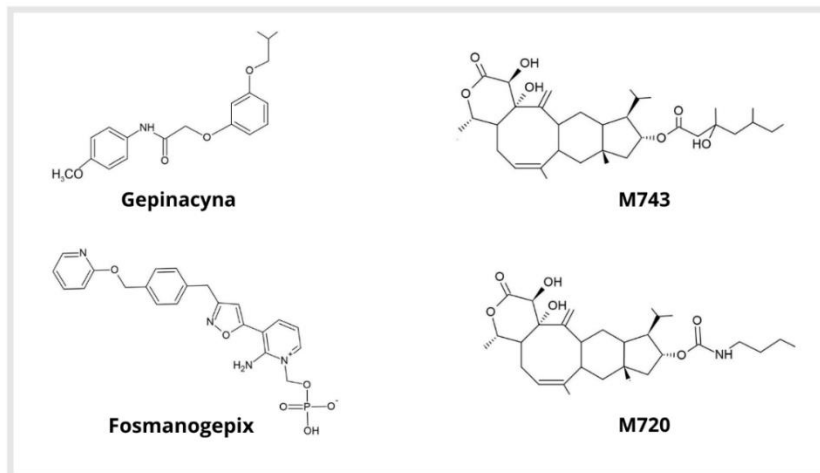
Rysunek 8. Inhibitory syntazy chityny o potencjale przeciwgrzybiczym; opracowanie własne



Rysunek 9. Struktura chemiczna związku o potencjale hamującym na szlak syntezy trehalozy; opracowanie własne

Potencjalną grupą nowych celów dla leków przeciwgrzybiczych są również enzymy zaangażowane w syntezę glikolipidów takich jak np. glikozylofosfatydyloinozytole, które kotwiczą wybrane białka do ściany komórkowej grzybów. Wskazano tutaj enzym – acetylotransferazę Gwt1, dla której opisano dwa inhibitory: gepinacynę (amid kwasu monokarboksylowego, pochodna kwasu fenylooctowego) oraz aminopirydynę – fosmanogepix (APX001, E1210) [52, 53] (rys. 10). Innym celem potencjalnych leków przeciwgrzybiczych w tym szlaku metabolicznym może być enzym fosfotransferaza etanoloaminy, dla której opisano również dwa potencjalne inhibitory – M743 oraz

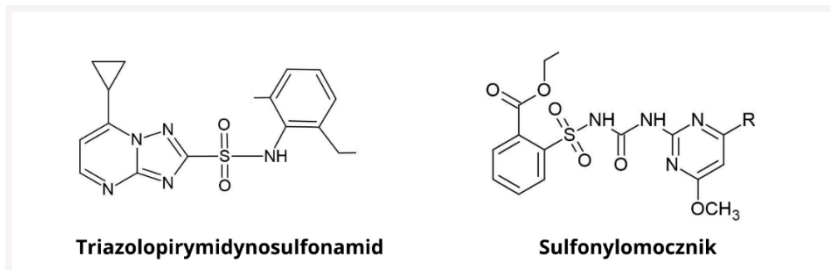
M720 (związki oparte na pierścieniu laktonowym terpenoidów) [54] (rys. 10). Fosmanogepix, który pomyślnie przeszedł drugą fazę badań klinicznych, charakteryzuje się szerokim spektrum działania i w najbliższym czasie ma duże szanse wejść na rynek farmaceutyczny jako reprezentant nowej grupy leków określanych jako inhibitory Gwt1. Wykazuje on działanie przeciwgrzybicze w infekcjach powodowanych przez grzyby z rodzajów: *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Cladosporium* czy *Fusarium* [53].



Rysunek 10. Związki będące potencjalnymi inhibitorami enzymów zaangażowanych w syntezę glikozylfosfatydyloinozytoli; opracowanie własne

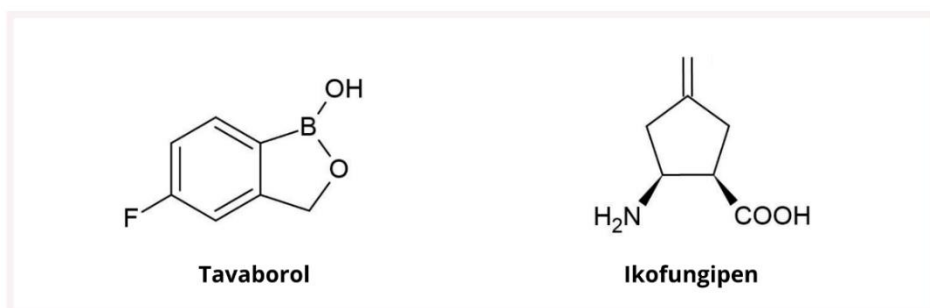
### 3.2. Enzymy związane z procesem translacji i syntezy egzogennych dla człowieka aminokwasów

Synteza egzogennych dla człowieka aminokwasów, do których należą aminokwasy o rozgałęzionych łańcuchach, jak też specyficzne enzymy związane z wbudowywaniem tych aminokwasów w strukturę białek, znalazła się w obszarze zainteresowań poszukiwaczy nowych leków przeciwgrzybiczych. Syntetaza aceto hydroksykwasów (AHAS) jest to kluczowy enzym zaangażowany w biosyntezę aminokwasów o rozgałęzionych łańcuchach. Potencjalnymi inhibitorami tego enzymu są triazylopirymidynosulfonamid i sulfonylomocznik [55] (rys. 11). Triazylopirymidynosulfonamid został zidentyfikowany jako inhibitor AHAS *Saccharomyces cerevisiae* i wykazał potencjalnie szerokie spektrum działania przeciwgrzybiczego, natomiast sulfonylomocznik wykazał działanie tylko w stosunku do *Candida albicans*, jednak trwają prace nad jego analogami w celu rozszerzenia spektrum działania [5, 56].



Rysunek 11. Potencjalne inhibitory syntetazy aceto hydroksykwasów (AHAS); opracowanie własne

Specyficzne dla grzybów syntetazy aminoacylo-tRNA (AaRSs) są enzymami niezbędnymi dla prawidłowego procesu translacji podczas biosyntezy białek. Enzymy te katalizują przyłączenie prawidłowego aminokwasu do odpowiadającego mu tRNA. Jako obiecujące cele nowych leków przeciwgrzybiczych wybrano enzymy takie jak: syntetaza leucylo-tRNA oraz syntetaza izoleucylo-tRNA. Specyficznym inhibitorem dla syntetazy leucylo-tRNA jest Tavaborol (rys. 12), który od 2014 roku stosowany jest jako lek na grzybicę paznokci. Może on być stosowany jedynie powierzchniowo w przypadkach grzybiczy paznokci wywołanej przez grzyby z rodzaju *Trichophyton* [57]. Nie udało się opracować pochodnej tego związku, która wykazywałaby działanie w grzybicach ogólnoustrojowych. W przypadku syntetazy izoleucylo-tRNA potencjalnym inhibitorem jest syntetyczna pochodna naturalnie występującego związku cispentacyny, o nazwie ikofungipen [58] (rys. 12). Jednak związek ten wymaga wciąż dalszych optymalizacji struktury i późniejszych badań klinicznych, aby mógł wejść na rynek farmaceutyczny. Obecnie badania nad wykorzystaniem ikofungipenu w leczeniu grzybic zatrzymały się po pierwszej fazie badań klinicznych [5].



Rysunek 12. Inhibitory wybranych syntetaz aminoacylo-tRNA; opracowanie własne

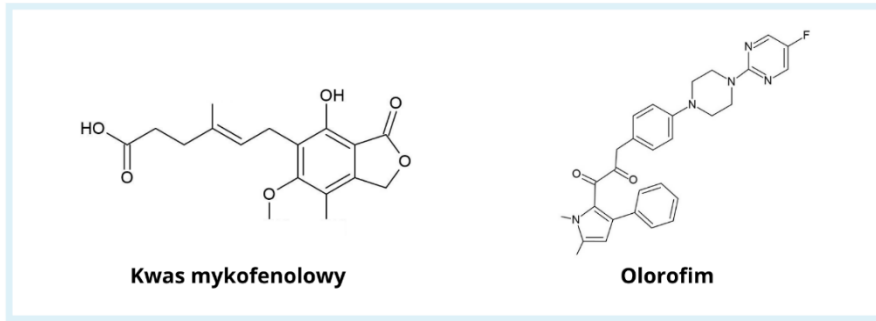
### 3.3. Enzymy zaangażowane w syntezę puryn i pirymidyn

Dehydrogenaza monofosforanu inozyny zaangażowana w syntezę guanozynotriofosforanu ma kluczowe znaczenie dla wzrostu i zjadliwości niektórych chorobotwórczych grzybów, natomiast syntetaza adenylbursztynianowa jest kluczowym enzymem w szlaku biosyntezy adenozyntriofosforanu. Nie udało się jednak opracować inhibitorów specyficznych dla syntetazy adenylbursztynianowej, natomiast jedynym zidentyfikowanym do tej pory związkiem wykazującym działanie hamujące aktywność dehydrogenazy monofosforanu inozyny jest kwas mykofenolowy (rys. 13). Związek ten działa fungistatycznie na grzyby z rodzaju *Cryptococcus* [59, 60].

W przypadku szlaków syntezy pirymidyn – nowym celem dla leków przeciwgrzybiczych okazała się dehydrogenaza dihydroorotanowa. Hamujące działanie wykazuje tutaj związek o nazwie olorofim (rys. 13), który wykazał bardzo dobre efekty hamowania wzrostu wielu pleśniaków i pomyślnie przeszedł II fazę badań klinicznych [61, 62]. W najbliższym czasie olorofim może wejść na rynek farmaceutyczny jako pierwszy związek z nowej grupy leków przeciwgrzybiczych określanych jako orotomidy [63].

Olorofim wykazuje aktywność wobec grzybów z rodzajów: *Aspergillus*, *Coccidioides*, *Trichophyton*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Scedosporium*, *Lomentospora* i *Alternaria*. Nie wykazuje on jednak działania wobec drożdżaków (np. *Candida spp.*) czy pleśni z rzędu *Mucorales* [61, 63].





Rysunek 13. Inhibitory enzymów zaangażowanych w syntezę puryn (kwas mykofenolowy) i pirymidyn (olorofim); opracowanie własne

Tabela 2. Szlaki metaboliczne i uczestniczące w nich enzymy brane obecnie pod uwagę jako perspektywiczne cele nowych leków przeciwgrzybiczych

Szlak metaboliczny	Enzym	Potencjalne inhibitory	Spektrum działania
Synteza specyficznych cukrów	Syntaza B-1,6-D-glukanu	Pochodna pirydobenzimidazolu (D75-4590)	<i>Candida spp.</i>
	Syntaza chityny	Polioksyna D Nikkomycyna Z	<i>Coccidioides immitis</i> , <i>Histoplasma capsulatum</i> , <i>Blastomyces dermatitidis</i>
	Syntaza trehalozo-6-fosforanu (Tps1) Fosfataza trehalozo-6-fosforanowa (Tps2)	Closantel	<i>Cryptococcus spp.</i>
Synteza glikolipidów	Acetylotransferaza Gwt1	Fosmanogepix (APX001, E1210) Gepinacyna	<i>Aspergillus spp.</i> , <i>Candida spp.</i> , <i>Cladosporium spp.</i> , <i>Cryptococcus spp.</i> , <i>Fusarium spp.</i> , <i>Candida spp.</i> , <i>Aspergillus spp.</i>
	Fosfotransferaza etanoloaminy Mcd4	M743 M720	
Synteza egzogennych aminokwasów i translacja	Syntetaza acetoahydroksykwasów (AHAS)	Triazolopirymidyno-sulfonamid	<i>Candida albicans</i>
	Syntetazy aminoacylo-tRNA: – syntetaza leucylo-tRNA – syntetaza izoleucylo-tRNA	Sulfonylomocznik Tavaborol Ikofungipen	<i>Trichophyton spp.</i> <i>Candida spp.</i>
Synteza puryn i pirymidyn	Synteza puryn: – dehydrogenaza monofosforanu inozyny (IMPDH)	Kwas mykofenolowy	<i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Aspergillus spp.</i> <i>Talaromyces spp.</i> <i>Trichophyton spp.</i> <i>Coccidioides spp.</i>
	Synteza pirymidyn: – dehydrogenaza dihydroorotanolowa	Olorofim	<i>Penicillium spp.</i> <i>Alternaria spp.</i> <i>Fusarium spp.</i> <i>Scedosporium spp.</i> <i>Lomentospora spp.</i>

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [5, 61, 64].

## 4. Podsumowanie

Coraz lepsze poznanie specyficznych szlaków metabolicznych różniących metabolizm ludzi i grzybów, jak również specyfiki struktury enzymów katalizujących podobne procesy pomimo pokrewieństwa filogenetycznego komórek eukariotycznych, pozwala na lokalizowanie nowych potencjalnych celów dla leków przeciwgrzybiczych (tab. 2). Należy jednak pamiętać, że czas od identyfikacji potencjalnego celu do faktycznego zastosowania klinicznego jest bardzo długi. Dlatego też nie należy rezygnować z dalszych optymalizacji związków skierowanych wobec już znanych, dobrze scharakteryzowanych celów w komórkach grzybów. Rozwój technik badania struktur białkowych i wyszukiwania potencjalnych inhibitorów może znacząco przyspieszyć opracowywanie nowych leków o wysokiej selektywności działania w stosunku do grzybów i niskiej toksyczności w odniesieniu do naszych komórek. Stąd też istnieje duża szansa, że w ciągu najbliższych lat będziemy dysponować nowymi generacjami leków, które dadzą możliwości zwalczania obecnie lekoopornych patogenów grzybowych. Wskazane powyżej perspektywiczne kierunki rozwoju poszukiwań nowych leków przeciwgrzybiczych napawają optymizmem w świetle powszechności zakażeń grzybiczych, ograniczonej liczby znanych środków przeciwgrzybiczych i rosnącej lekooporności grzybów na standardowe terapie.

## Literatura

1. Brown G.D., Denning D.W., Gow N.A.R., Levitz S.M., Netea M.G., White T.C., *Hidden killers: human fungal infections*, Science Translational Medicine, 4, 2012, s. 1-9.
2. Firacative C., *Invasive fungal disease in humans. Are we aware of the real impact?* Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 115, 2020, s. 1-9.
3. Revie N.M., Iyer K.R., Robbins N., Cowen L.E., *Antifungal drug resistance – evolution, mechanisms and impact*, Current Opinion in Microbiology, 45, 2018, s. 70-76.
4. Cowen L.E., *Predicting the emergence of resistance to antifungal drugs*, FEMS Microbiology Letters, 204, 2001, s. 1-7.
5. Liu N., Tu J., Dong G., Wang Y., Sheng C., *Emerging new targets for the treatment of resistant fungal infections*, Journal of Medicinal Chemistry, 61, 2018, s. 5484-5511.
6. Chang Y.L., Yu S.J., Heitman J., Wellington M., Chen Y.L., *New facets of antifungal therapy*, Virulence, 8, 2017, s. 222-236.
7. Georgopapadakou N.H., Dix B.A., Smith S.A., Freudenberg J., Funke P.T., *Effect of antifungal agents on lipid biosynthesis and membrane integrity in Candida albicans*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 31, 1987, s. 46-51.
8. Robbins N., Wright G.D., Cowen L.E., *Antifungal drugs – the current armamentarium and development of new agents*, Microbiology Spectrum, 4, 2016, s. 1-20.
9. Ali Malayeri F., Rezaei A., Raiesi O., *Antifungal agents: polyene, azole, antimetabolite, other and future agents*, Journal of Basic Research in Medical Sciences, 5, 2018, s. 48-55.
10. Woolley D., *Some biological effects produced by benzimidazole and their reversal by purines*, Journal of Biological Chemistry, 1944, s. 225-233.
11. Fromtling R.A., *Overview of medically important antifungal azole derivatives*, Clinical Microbiology Reviews, 1, 1988, s. 187-217.
12. Shafiei M., Peyton L., Hashemzadeh M., Foroumadi A., *History of the development of antifungal azoles. A review on structures, SAR, and mechanism of action*, Bioorganic Chemistry, 104, 2020, s. 104240.
13. Jordá T., Puig S., *Regulation of ergosterol biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae*, Genes, 11, 2020, s. 1-18.

14. Arikan-Akdagli S., Ghannoum M., Meis J.F., *Antifungal resistance: specific focus on multidrug resistance in Candida auris and secondary azole resistance in Aspergillus fumigatus*, Journal of Fungi, 4, 2018, s. 1-13.
15. Maertens J.A., *History of the development of azole derivatives*, Clinical Microbiology and Infection, 10, 2004, s. 1-10.
16. Peyton L.R., Gallagher S., Hashemzadeh M., *Triazole antifungal. A review*, Drugs of Today, 51, 2015, s. 705-718.
17. Hargrove T.Y., Garvey E.P., Hoekstra W.J., Yates C.M., Wawrzak Z., Rachakonda G., *Crystal structure of the new investigational drug candidate VT-1598 in complex with Aspergillus fumigatus sterol 14 $\alpha$ -demethylase provides insights into its broad-spectrum antifungal activity*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 61(7), 2017.
18. Brown M., Traynor M., *Treatment of fungal nail infections*, Drug Delivery Report, 2007, s.17-19.
19. Newland J.G., Abdel-Rahman S.M., *Update on terbinafine with a focus on dermatophytosis*, Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology, 2, 2009, s. 49-3.
20. Kyle A.A., Dahl M., *Topical therapy for fungal infections*, American Journal of Clinical Dermatology, 5, 2004, s. 443-451.
21. Polak-Wyss A., *Mechanism of action of antifungals and combination therapy*, Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 4, 1995, s. 11-16.
22. Zaug M., Bergstraesser M., *Amorolfine in the treatment of onychomycoses and dermatomycoses (an overview)*, Clinical and Experimental Dermatology, 17, 1992, s. 61-70.
23. Seidl H.P., Jäckel A., Müller J., Schaller M., Borelli C., Polak A., *Sporicidal effect of amorolfine and other antimycotics used in the therapy of fungal nail infections*, Mycoses, 58, 2015, s. 610-619.
24. Gow N.A.R., Latge J.P., Munro C.A., *The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function*, Microbiology Spectrum, 5, 2017, s. 1-25.
25. Cortés J.C.G., Curto M-Á., Carvalho V.S.D., Pérez P., Ribas J.C., *The fungal cell wall as a target for the development of new antifungal therapies*, Biotechnology Advances, 37, 2019, s. 107352.
26. Aguilar-Zapata D., Petraitiene R., Petraitis V., *Echinocandins – the expanding antifungal armamentarium*, Clinical Infectious Diseases, 6, 2015, s. 604-611.
27. Hüttel W., *Echinocandins – structural diversity, biosynthesis, and development of antimycotics*. Applied Microbiology and Biotechnology, 105, 2021, s. 55-66.
28. Mroczyńska M., Brillowska-Dąbrowska A., *Review on current status of echinocandins use*, Antibiotics, 9, 2020, s. 1-18.
29. Emri T., Majoros L., Tóth V., Pócsi I., *Echinocandins – production and applications*, Applied Microbiology and Biotechnology, 97, 2013, s. 3267-3284.
30. Lesage G., Sdicu A.M., Ménard P., Shapiro J., Hussein S., Bussey H., *Analysis of beta-1,3-glucan assembly in Saccharomyces cerevisiae using a synthetic interaction network and altered sensitivity to caspofungin*, Genetics, 167, 2004, s. 35-49.
31. Cowen L.E., Steinbach W.J., *Stress, drugs, and evolution. The role of cellular signaling in fungal drug resistance*, Eukaryotic Cell, 7, 2008. s. 747-764.
32. Szymański M., Chmielewska S., Czyżewska U., Malinowska M., Tylicki A., *Echinocandins – structure, mechanism of action, and use in antifungal therapy*, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 37(1), 2022, s. 876-894, DOI: 10.1080/14756366.2022.2050224.
33. Stan C.D., *Echinocandins – new antifungal agents*, Revista Medico-chirurgicala a Societatii de Medici si Naturalisti din Iasi, 118, 2014, s. 528-536.
34. Chen S.C.A., Slavin M.A., Sorrell T.C., *Echinocandin antifungal drugs in fungal infections – a comparison*, Drugs, 71, 2011 s. 11-41.

35. Garcia-Effron G., *Rezafungin-mechanisms of action, susceptibility and resistance: similarities and differences with the other echinocandins*, Journal of Fungi, 6, 2020, s. 1-23.
36. Zhao Y., Perlin D.S., *Review of the novel echinocandin antifungal rezafungin – animal studies and clinical data*, Journal of Fungi, 6, 2020, s. 1-9.
37. Chamilos G., Lewis R.E., Albert N., Kontoyiannis D.P., *Paradoxical effect of echinocandins across Candida species in vitro. Evidence for echinocandin-specific and Candida species-related differences*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 51, 2007, s. 2257-2259.
38. Patil A., Majumdar S., *Echinocandins in antifungal pharmacotherapy*, Journal of Pharmacy and Pharmacology, 69, 2017, s. 1635-1660.
39. Drew R.H., *Flucytosine*, Antifungal Therapy, 2019, s. 177-191.
40. Groll A.H., Piscitelli S.C., Walsh T.J., *Clinical pharmacology of systemic antifungal agents. A comprehensive review of agents in clinical use, current investigational compounds, and putative targets for antifungal drug development*, Advances in Pharmacology, 44, 1998, s. 343-500.
41. Espinel-Ingroff A., Shadomy S., *In vitro and in vivo evaluation of antifungal agents*, European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 8, 1989, s. 352-361.
42. Morio F., Jensen R.H., le Pape P., Arendrup M.C., *Molecular basis of antifungal drug resistance in yeasts*, International Journal of Antimicrobial Agents, 50, 2017, s. 599-606.
43. Sharma C., Chowdhary A., *Molecular bases of antifungal resistance in filamentous fungi*, International Journal of Antimicrobial Agents, 50, 2017, s. 607-616.
44. Mazu T.K., Bricker B.A., Flores-Rozas H., Ablordeppey S.Y., *The Mechanistic Targets of Antifungal Agents – an overview*, Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 16, 2016, s. 555-578.
45. Anwar S., Glaser A., Acharya S., Yousaf F., *Candida auris – an impending threat: A case report from home*, American Journal of Infection Control, 48, 2020, s. 1407-1408.
46. Georgopapadakou N.H., Tkacz J.S., *The fungal cell wall as a drug target*, Trends in Microbiology, 3, 1995, s. 98-104.
47. Kitamura A., Someya K., Hata M., Nakajima R., Takemura M., *Discovery of a small-molecule inhibitor of {beta}-1,6-glucan synthesis*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 53, 2009, s. 670-677.
48. Jackson K.E., Pogula P.K., Patterson S.E., *Polyoxin and nikkomycin analogs. Recent design and synthesis of novel peptidyl nucleosides*, Heterocyclic Communications, 19, 2013, s. 375-386.
49. Vecht-Lifshitz S.E., Sasson Y., Braun S., *Nikkomycin production in pellets of Streptomyces tendae*, Journal of Applied Bacteriology, 72, 1992, s. 195-200.
50. Gonçalves L.M., Trevisol E.T.V., de Azevedo Abraham Vieira B., de Mesquita J.F., *Trehalose synthesis inhibitor. A molecular in silico drug design*, Journal of Cellular Biochemistry, 121, 2020, s. 1114-1125.
51. Perfect J.R., Tenor J.L., Miao Y., Brennan R.G., *Trehalose pathway as an antifungal target*, Virulence, 8, 2017, s. 143-149.
52. Liston S.D., Whitesell L., McLellan C.A., Mazitschek R., Petraitis V., Petraitiene R., *Antifungal activity of gepinacin scaffold glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis inhibitors with improved metabolic stability*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 64(10), 2020.
53. Shaw K.J., Ibrahim A.S., *Fosmanogepix. A review of the first-in-class broad spectrum agent for the treatment of invasive fungal infections*, Journal of Fungi, 6, 2020, s. 1-21.
54. Yadav U., Khan M.A., *Targeting the GPI biosynthetic pathway*, Pathogens and Global Health, 112, 2018, s. 115-122.
55. Richie D.L., Thompson K., Studer C., Prindle V.C., Aust T., Riedl R., *Identification and evaluation of novel acetolactate synthase inhibitors as antifungal agents*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 57, 2013, s. 2272-2280.

56. Lee Y.T., Cui C.J., Chow E.W.L., Pue N., Lonhienne T., Wang J.G., *Sulfonyleureas have antifungal activity and are potent inhibitors of Candida albicans acetohydroxyacid synthase*, Journal of Medicinal Chemistry, 56, 2013, s. 210-219.
57. Gupta A.K., Versteeg S.G., *Tavaborole – a treatment for onychomycosis of the toenails*, Expert Review of Clinical Pharmacology, 9, 2016, s. 1145-1152.
58. Petraitiene R., Petraitis V., Kelaher A.M., Sarafandi A.A., Mickiene D., Groll A.H., *Efficacy, plasma pharmacokinetics, and safety of icofungipen, an inhibitor of Candida isoleucyl-tRNA synthetase, in treatment of experimental disseminated candidiasis in persistently neutropenic rabbits*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49, 2005, s. 2084-2092.
59. Morrow C.A., Valkov E., Stamp A., Chow E.W.L., Lee I.R., Wronski A., *De novo GTP biosynthesis is critical for virulence of the fungal pathogen Cryptococcus neoformans*, PLoS Pathogens, 8(10), 2012, s. 1002957.
60. Blundell R.D., Williams S.J., Arras S.D.M., Chitty J.L., Blake K.L., Ericsson D.J., *Disruption of de novo adenosine triphosphate (ATP) biosynthesis abolishes virulence in Cryptococcus neoformans*, ACS Infectious Diseases, 2, 2016, s. 651-663.
61. McCarty T.P., Pappas P.G., *Antifungal pipeline*, Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 11, 2021, s. 1-11.
62. Perfect J.R., *The antifungal pipeline – a reality check*, Nature Reviews Drug Discovery, 16, 2017, s. 603-616.
63. Wiederhold N.P., *Review of the novel investigational antifungal Olorofim*, Journal of Fungi, 6, 2020, s. 1-11.
64. Ibe C., Munro C.A., *Fungal cell wall – an underexploited target for antifungal therapies*, PLOS Pathogens, 17(4), 2021.

## **Enzymy jako ważny cel leków przeciwgrzybiczych**

### Streszczenie

W dobie narastającej lekooporności u patogenów grzybowych niezbędne jest poszukiwanie nowych potencjalnych celów dla leków przeciwgrzybiczych. Niniejsza praca podsumowuje wybrane informacje o aktualnie stosowanych antymikotykach o charakterze inhibitorów enzymów i ich nowych analogach. Przedstawione zostały również wybrane (aktualnie badane) cele dla leków przeciwgrzybiczych, które stanowią enzymy zaangażowane m.in. w szlaki syntezy cukrów, glikolipidów, aminokwasów czy też syntezę DNA. Opracowywanie nowych leków o całkowicie innym mechanizmie działania może dać szansę na zwalczanie wielolekoopornych patogenów i ograniczyć niepowodzenia terapeutyczne związane z postępującą lekoopornością grzybów na obecnie wykorzystywane antybiotyki.

Słowa kluczowe: szlak mewalonowy, synteza cukrów, metabolizm zasad azotowych, biosynteza białek, specyfika enzymów

## **Enzymes as an important target of antifungal drugs**

### Abstract

In the era of increasing drug resistance in fungal pathogens, it is necessary to search for new potential targets for antifungal drugs. This paper summarizes selected information about the currently used antimycotics, such as enzyme inhibitors and their new analogues. Selected, currently widely researched, new targets for antifungal drugs, which are enzymes involved into the pathways of the synthesis of sugars, glycolipids, amino acids or DNA synthesis are also presented. The development of new drugs with a completely different mechanism of action may provide an opportunity to combat multidrug resistant pathogens and reduce therapeutic failures related to the progressive drug resistance of fungi to currently used antibiotics.

Keywords: mevalone pathway, sugar synthesis, nitrogen base metabolism, protein biosynthesis, specificity of enzymes

# Porównanie hydrolizy skrobi ziemniaczanej z zastosowaniem $\alpha$ -amylazy natywnej i immobilizowanej na nośnikach polimerowych

## 1. Wprowadzenie

Obecnie coraz więcej produktów otrzymywanych jest w procesach technologicznych z udziałem biokatalizatorów [1, 2]. Enzymy mają wiele cech decydujących o atrakcyjności ich zastosowania, takich jak łatwość kontrolowania i regulacji katalizowanej reakcji, specyficzność, łagodność warunków działania, a także bezpieczeństwo stosowania wynikające z naturalnego pochodzenia i działania w niskich stężeniach [3, 4].

Enzymy wykorzystuje się do przetwarzania skrobi na skalę przemysłową od ponad 40 lat [5]. Enzymy działające na skrobię można podzielić na: 1) hydrolazy egzo- i endo-, które rozkładają wiązania  $\alpha$ -1,4- i  $\alpha$ -1,6-glikozydowe; 2) glukotransferazy działające na wiązania  $\alpha$ -1,4- i  $\alpha$ -1,6-glikozydowe; 3) oksydoreduktazy katalizujące utlenianie i redukcję poszczególnych grup [6, 7]. Wymagania stawiane enzymom do celów przemysłowych są stosunkowo wysokie [8]. Obecnie w przemyśle coraz popularniejsze są enzymy w formie immobilizowanej, co z jednej strony najczęściej obniża ich aktywność, natomiast z drugiej wielokrotnie zwiększa stabilność oraz zapewnia ciągłość i stałą kontrolę procesu produkcyjnego [9].

Immobilizacja enzymów polega na unieruchomieniu, fizycznym ograniczeniu, zatrzymaniu preparatu w reaktorze [10]. Celem immobilizacji jest przeniesienie zalet katalizy heterogenicznej na rozpuszczalne katalizatory enzymatyczne [11]. Immobilizacja enzymów posiada wiele zalet, takich jak zwiększenie stabilności w szerszym zakresie pH i temperatury, możliwość użycia w wielu cyklach reakcji lub w procesach ciągłych łatwiejsze oddzielenie produktów, możliwość immobilizacji kilku enzymów jednocześnie, prostsza praca reaktorów i duży ich wybór [12]. Głównymi wadami są: utrata bądź zmniejszenie aktywności, ograniczenie dyfuzji oraz dodatkowe koszty związane z produkcją i aktywacją nośnika oraz mechanizmem unieruchamiania [13]. Znanych jest wiele metod immobilizacji enzymów, w zależności od typu wiązania, tj. kowalencyjne, adsorpcyjne, uwięzienie w matrycy, mikrokapsułkowanie, sieciowanie, odwracalne i nieodwracalne [14, 15]. W literaturze opisano wiele przykładów nośników do unieruchamiania enzymów: naturalne, syntetyczne, organiczne, nieorganiczne [16, 17]. Poszczególne immobilizacje posiadają swoje zalety i wady, dlatego dla każdego enzymu i każdego substratu należy dobrać odpowiedni nośnik i metodę immobilizacji.

Korzystnym sposobem unieruchomienia enzymu na nośniku jest wiązanie kowalencyjne. Pozwala na silne umocowanie enzymu, zapobiega jego odszczepieniu, ułatwiając jednocześnie kontakt z substratem, gdyż enzym eksponowany jest na powierzchni [18]. Ponadto wiązanie kowalencyjne enzymu z nośnikiem często zwiększa odporność temperaturową takiego biokatalizatora. Grupami funkcyjnymi nośników najczęściej wyko-

<sup>1</sup> [anna.konieczna-molenda@urk.edu.pl](mailto:anna.konieczna-molenda@urk.edu.pl), Katedra Chemii, Wydział Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, ul. Balicka 1226, 30-149 Kraków, <https://wtz.urk.edu.pl/>.

rzystywanymi w procesie tworzenia wiązania kowalencyjnego z białkiem są: hydroksylowa, karboksylowa, aminowa i oksiranowa [19,20]. Silne związanie enzymu z nośnikiem może powodować zjawisko obniżenia, a w skrajnym przypadku utraty aktywności katalitycznej spowodowane blokowaniem dostępu substratu do centrum aktywnego [21]. Aby temu zjawisku zapobiec stosuje się tzw. łącznik, którym jest najczęściej aldehyd glutarowy. Jest on nietoksyczny, a dodatkowo bakterio-, wiruso- i grzybobójczy [22].

Celem niniejszej pracy jest immobilizacja komercyjnie dostępnego enzymu  $\alpha$ -amylazy na nośnikach polimerowych, otrzymanie biokatalizatorów o wysokiej aktywności, ich przetestowanie w kilku cyklach reakcji hydrolizy skrobi oraz wyznaczenie i porównanie stałych szybkości reakcji katalizowanych enzymem natywnym i immobilizowanym na nośnikach.

## 2. Materiały i metody

### 2.1. Enzym zastosowany do reakcji hydrolizy skrobi

Badaniom poddano  $\alpha$ -amylazę natywną oraz  $\alpha$ -amylazę po immobilizacji na nośnikach. Do badań wybrano  $\alpha$ -amylazę SPEZME® PRIME 107-05127-001 (Genencor International, USA) z genetycznie modyfikowanych organizmów *Geobacillus stearothermophilus* z aktywnością deklarowaną przez producenta (około 7163 U/g), w stałych warunkach pH 5.0–6.5 i w temperaturze 35–50°C.

### 2.2. Skrobia testowana w reakcji hydrolizy

Aktywność katalityczną biokatalizatorów otrzymanych w wyniku immobilizacji  $\alpha$ -amylazy testowano w reakcjach hydrolizy skrobi ziemniaczanej (Kupiec, Polska).

### 2.3. Nośniki polimerowe do immobilizacji enzymu

Jako monomeru do otrzymania polimerowych nośników użyto N-winyloformamid, NVF (Sigma-Aldrich), jako sieciownik posłużył diwinylobenzen, DVB, dichlorowodorek 2,2'-azobis(2-metylopropionamidyny) – Sigma-Aldrich.

Nośniki polimerowe p(NVF-co-DVB) otrzymano w wyniku syntezy metodą kopolimeryzacji rodnikowej w odwróconej suspensji [23]. Kopolimeryzację sieciującą N-winyloformamidu i diwinylobenzenu prowadzono w atmosferze obojętnej, pod delikatnym strumieniem argonu. Kopolimeryzację sieciującą NVF z DVB realizowano w odwróconej suspensji w oleju metylosilikonowym. W okrągłodennej kolbie reakcyjnej o pojemności 250 cm<sup>3</sup>, zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną, mieszadło mechaniczne, termometr i kapilarę do barbotowania argonem umieszczono 50 cm<sup>3</sup> oleju silikonowego i ogrzewano do zadanej temperatury, barbotując argonem, po czym przy intensywnym mieszaniu wkraplano mieszaninę monomerów. Polimeryzację prowadzono w temp. 600°C w czasie 4 godzin. Ziarna usieciowanego polimeru zdekantowano, umieszczono w lejku Buchnera na sączku bibułowym i przemywano kilkakrotnie toluenem w celu odmycia oleju silikonowego.

Otrzymano polimerowy nośnik z merami N-winyloformamidowymi, który podzielono na dwie części, jedną część nośnika aktywowano na powierzchni aldehydem glutarowym (GA) [24].

Oznaczenie symboli nośników p(NVF-co-DVB) GA i p(NVF-co-DVB): p(NVF – polimeryzacji poddano N-winyloformamid, co- z DVB – w reakcji kopolimeryzacji z DVB, GA – oznacza nośnik aktywowany aldehydem glutarowym.

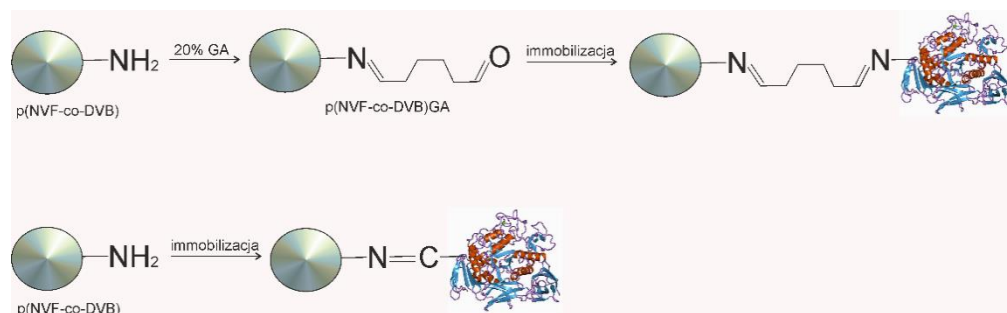
## 2.4. Aktywacja nośnika p(NVF-co-DVB) aldehydem glutarowym

Jedną część polimeru p(NVF-co-DVB) poddano aktywacji aldehydem glutarowym (GA) (Sigma-Aldrich) o stężeniu 20%. W tym celu w kolbie okrągłodennej o objętości 100 cm<sup>3</sup> umieszczono 30 cm<sup>3</sup> przygotowanego wcześniej roztworu GA i wprowadzono nośnik p(NVF-co-DVB). Całość ogrzewano w łaźni wodnej, ciągle mieszając. Reakcję prowadzono przez 4 godziny w temperaturze 50°C. Po zakończonej reakcji nośnik polimerowy odsączono na lejku Büchnera i przemyto buforem fosforanowym pH 7,0. Nośnik wysuszono w suszarce próżniowej w temperaturze 40°C [25].

## 2.5. Immobilizacja $\alpha$ -amylazy na nośnikach polimerowych

Do 0,10  $\pm$  0,01g nośnika dodano 11,5 cm<sup>3</sup> buforu fosforanowego pH 7,0 oraz 0,5 cm<sup>3</sup> enzymu i mieszano na mieszadle magnetycznym przez 2 godziny. Następnie przesączono na lejku Büchnera przez sącdek celulozowy o średnicy porów 0,2  $\mu$ m (Whatman). W przesączu po immobilizacji oznaczono ilość enzymu.

Otrzymany biokatalizator przemywano po kolei roztworami buforowymi: fosforanowym pH 7,0, fosforanowym pH 7,0 + 0,5 M NaCl, octanowym pH 5,5 i TRIS-Cl pH 7,2. Otrzymane biokatalizatory testowano w reakcji enzymatycznej hydrolizy skrobi ziemniaczanej.



Rysunek 1. Schemat immobilizacji  $\alpha$ -amylazy na nośniku z aldehydem glutarowym p(NVF-co-DVB) GA i na nośniku bez aldehydu p(NVF-co-DVB) [opracowanie własne]

## 2.6. Reakcja enzymatycznej hydrolizy skrobi

W celu przeprowadzenia reakcji hydrolizy skrobi przygotowano kleik skrobiowy o stężeniu 1,25 mol/dm<sup>3</sup>, który następnie termostatowano w temperaturze 37°C i dodano biokatalizator – w tym momencie rozpoczęto pomiar czasu reakcji. W określonych odstępach czasu pobierano po 2,0 cm<sup>3</sup> mieszaniny reakcyjnej, dodawano 2,0 cm<sup>3</sup> roztworu DNS, który powodował dezaktywację enzymu, kończąc reakcję hydrolizy skrobi. Próbkę przesączono przez sącdek celulozowy o średnicy porów 5  $\mu$ m (Whatman) i oznaczono zawartość cukrów redukujących metodą UV-Vis. Po zakończonej reakcji odzyskiwano enzym immobilizowany na nośniku polimerowym i używano go w kolejnych cyklach reakcji hydrolizy z nowymi roztworami skrobi.



## 2.7. Sposób oznaczania cukrów redukujących

Zawartość cukrów redukujących powstałych w reakcji hydrolizy skrobi oznaczono spektrofotometrycznie z zastosowaniem kwasu 3,5-dinitrosalicylowego (DNS) [26, 27]. Metodą spektrofotometryczną UV-Vis mierzono absorbancję roztworów w zakresie 490-500 nm. Pomiary wykonano na spektrofotometrze 2101PC Shimadzu. Zawartość cukrów redukujących wyznaczono korzystając z krzywej wzorcowej maltozy.

## 2.8. Oznaczanie zawartości białka metodą Lowry'ego

Ilość unieruchomionego na nośnikach enzymu wyznaczono na podstawie różnicy pomiędzy ilością enzymu w próbce do immobilizacji a ilością enzymu pozostającego w roztworze po immobilizacji [28], stosując metodę Lowry'ego [29,30]. Pomiary wykonano na spektrofotometrze UV-Vis 2101PC Shimadzu, a ilość białka w badanych próbkach oznaczono, korzystając z krzywej kalibracyjnej tyrozyny.

## 3. Wyniki

### 3.1. Wydajność immobilizacji $\alpha$ -amylazy

Wydajność immobilizacji określono jako procent unieruchomionego enzymu z próbki enzymu użytego do immobilizacji. Na nośniku polimerowym aktywowanym aldehydem glutarowym (GA) unieruchomieniu uległa większa ilość enzymu, bo aż 88%. W przypadku nośnika nie posiadającego na powierzchni łącznika w postaci aldehydu glutarowego zaimmobilizowało się 61% enzymu.

Tabela 1. Wydajność immobilizacji  $\alpha$ -amylazy na nośniku z aldehydem glutarowym: p(NVF-co-DVB) GA i bez GA: p(NVF-co-DVB)

Rodzaj nośnika	Wydajność immobilizacji [%]
p(NVF-co-DVB) GA	88
p(NVF-co-DVB)	61

Źródło: opracowanie własne

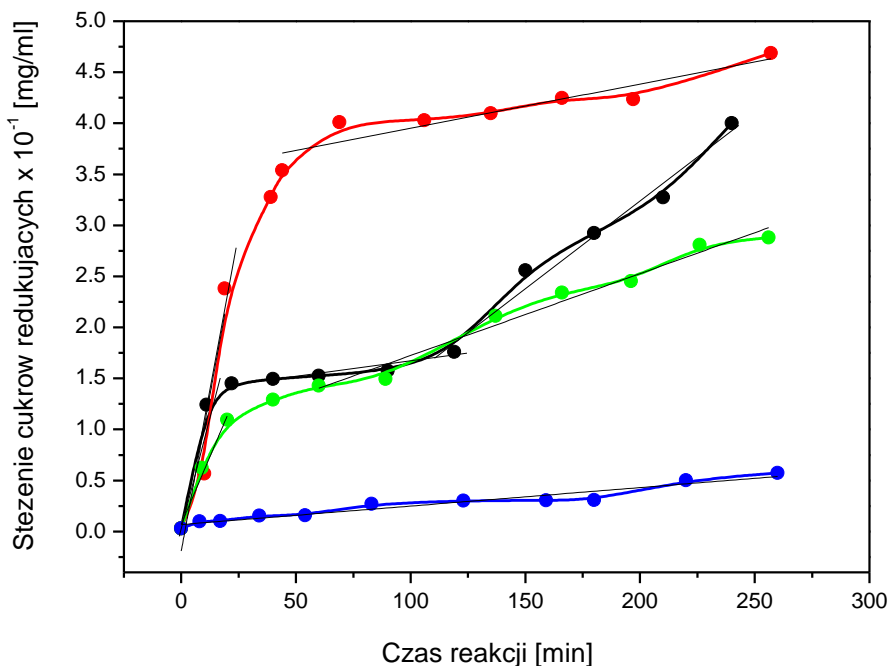
### 3.2. Badania aktywności biokatalizatorów w reakcji enzymatycznej hydrolizy skrobi ziemniaczanej

#### 3.2.1. $\alpha$ -amylaza immobilizowana na nośniku p(NVF-co-DVB)

Hydrolizę skrobi ziemniaczanej wykonano z  $\alpha$ -amylazą immobilizowaną na nośniku p(NVF-co-DVB) bez aldehydu glutarowego i dla porównania z taką samą ilością enzymu natywnego. Nośnik p(NVF-co-DVB) połączony był z białkiem przez wiązania amidowe.

Biokatalizatora użyto w trzech cyklach reakcji hydrolizy skrobi. Na wykresie 1 przedstawiono przebieg hydrolizy skrobi ziemniaczanej jako zależność stężenia cukrów redukujących od czasu reakcji.

Przebieg reakcji podzielono na etapy o liniowej zależności stężenia cukrów redukujących od czasu reakcji. Liniowa zależność sugeruje zerowy rząd reakcji hydrolizy z zastosowaniem  $\alpha$ -amylazy. Hydroliza skrobi ziemniaczanej katalizowana  $\alpha$ -amylazą natywną przebiegała w trzech etapach. Natomiast hydroliza z zastosowaniem enzymu immobilizowanego na nośniku p(NVF-co-DVB) jest dwuetapowa. Enzym immobilizowany zastosowany w III cyklu hydrolizy posiada niską aktywność, a reakcja przebiega jednoetapowo.



Wykres 1. Zależność stężenia cukrów redukujących od czasu reakcji hydrolizy skrobi ziemniaczanej z zastosowaniem: ---- enzymu natywnego, immobilizowanego na nośniku p(NVF-co-DVB): ---- cykl I, - - - cykl II, ---- cykl III [opracowanie własne]

Dla każdego z etapów hydrolizy wyznaczono wartości współczynnika nachylenia prostej (linie są widoczne na wykresie 1) stałej szybkości reakcji  $k$ .

W I cyklu reakcji enzym immobilizowany wykazuje znacznie wyższą aktywność niż enzym natywny. Świadczy o tym blisko dwukrotnie wyższa wartość stałej szybkości w pierwszym etapie hydrolizy ( $k_1$ ) oraz wysoka wydajność reakcji.

Tabela 2. Wartości stałych szybkości wyznaczone dla reakcji hydrolizy skrobi ziemniaczanej z zastosowaniem enzymu natywnego i immobilizowanego na nośniku p(NVF-co-DVB)

Enzym	$k_1 \times 10^{-2}$ [mg · ml <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> ]	$k_2 \times 10^{-2}$ [mg · ml <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> ]	$k_3 \times 10^{-3}$ [mg · ml <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> ]
nieimmobilizowany	6,2	0,3	1,6
na nośniku cykl I	12,3	0,5	-
na nośniku cykl II	5,4	0,9	-
na nośniku cykl III	0,3	-	-

Źródło: opracowanie własne

Wyznaczono wydajność hydrolizy skrobi z zastosowaniem  $\alpha$ -amylazy natywnej i immobilizowanej na nośniku p(NVF-co-DVB) po czasie 90 i 240 minut. Wydajność hydrolizy z zastosowaniem enzymu immobilizowanego jest w I cyklu reakcji znacznie większa niż reakcji z enzymem natywnym. W kolejnych dwóch cyklach wydajność reakcji jest mniejsza niż reakcji z enzymem natywnym. Należy jednak podkreślić, że biokatalizator nadal wykazuje aktywność katalityczną.

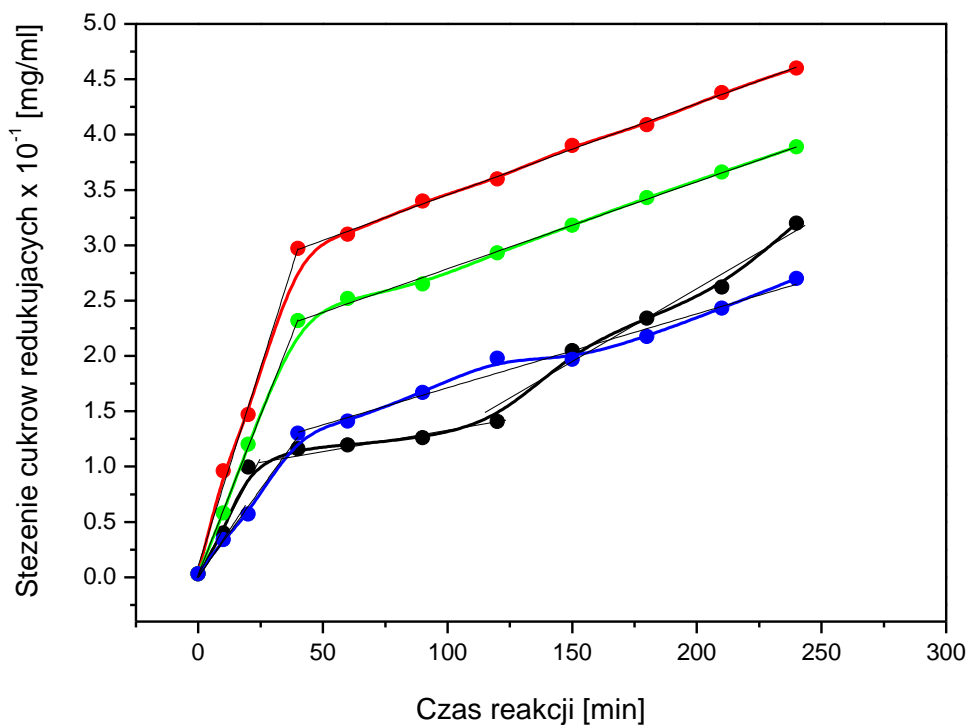
Tabela 3. Wydajność reakcji hydrolizy skrobi ziemniaczanej z zastosowaniem enzymu natywnego i immobilizowanego na nośniku p(NVF-co-DVB)

Enzym	Wydajność reakcji hydrolizy po czasie 90 min x 10 <sup>-1</sup> [mg · ml <sup>-1</sup> ]	Wydajność reakcji hydrolizy po czasie 240 min x 10 <sup>-1</sup> [mg · ml <sup>-1</sup> ]
nieimmobilizowany	1,7	4,1
na nośniku cykl I	4,0	4,5
na nośniku cykl II	1,4	2,6
na nośniku cykl III	0,2	0,6

Źródło: opracowanie własne.

### 3.2.2. $\alpha$ -Amylaza immobilizowana na nośniku z aldehydem glutarowym p(NVF-co-DVB) GA

Hydrolizę skrobi ziemniaczanej przeprowadzono z zastosowaniem  $\alpha$ -amylazy immobilizowanej na nośniku p(NVF-co-DVB) GA i dla porównania z taką samą ilością enzymu natywnego. Nośnik p(NVF-co-DVB) GA związany był z białkiem enzymatycznym poprzez łącznik, którym był aldehyd glutarowy.



Wykres 2. Zależność stężenia cukrów redukujących od czasu reakcji hydrolizy skrobi ziemniaczanej z zastosowaniem: ---- enzymu natywnego, immobilizowanego na nośniku p(NVF-co-DVB) GA: ---- cykl I, ---- cykl II, ---- cykl III [opracowanie własne]

Tabela 4. Wartości stałych szybkości wyznaczone dla reakcji hydrolizy skrobi ziemniaczanej z zastosowaniem enzymu natywnego i immobilizowanego na nośniku p(NVF-co-DVB) GA

Enzym	$k_1 \times 10^{-2}$ [mg · ml <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> ]	$k_2 \times 10^{-2}$ [mg · ml <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> ]	$k_3 \times 10^{-3}$ [mg · ml <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup> ]
nieimmobilizowany	4,8	0,31	1,42
na nośniku cykl I	7,2	0,82	-
na nośniku cykl II	5,8	0,79	-
na nośniku cykl III	3,1	0,67	-

Źródło: opracowanie własne

Biokatalizator otrzymany w wyniku immobilizacji enzymu wykazuje w dwóch cyklach hydrolizy skrobi wyższą aktywność niż enzym nieimmobilizowany. Potwierdzają to większe wartości stałych szybkości reakcji ( $k_1$  i  $k_2$ ) z zastosowaniem biokatalizatora.

Wydajność hydrolizy katalizowanej enzymem immobilizowanym na nośniku p(NVF-co-DVB) GA jest w przeważającej ilości przypadków znacznie większa niż wydajność reakcji z użyciem enzymu natywnego.

Tabela 5. Wydajność reakcji hydrolizy skrobi ziemniaczanej z zastosowaniem enzymu natywnego i immobilizowanego na nośniku p(NVF-co-DVB) GA

Enzym	Wydajność reakcji hydrolizy po czasie 90 min $\times 10^{-1}$ [mg · ml <sup>-1</sup> ]	Wydajność reakcji hydrolizy po czasie 240 min $\times 10^{-1}$ [mg · ml <sup>-1</sup> ]
nieimmobilizowany	1,3	3,2
na nośniku cykl I	3,4	4,6
na nośniku cykl II	2,6	3,9
na nośniku cykl III	1,7	2,7

Źródło: opracowanie własne

#### 4. Wnioski

1. Opracowano warunki reakcji pozwalające na unieruchomienie enzymu  $\alpha$ -amylazy na nośnikach polimerowych: z aldehydem glutarowym (GA) jako łącznikiem oraz bez łącznika.
2. W reakcji immobilizacji otrzymano różne wydajności: 61% w przypadku nośnika bez aldehydu glutarowego oraz 88% w przypadku nośnika z aldehydem glutarowym jako łącznikiem.
3. Biokatalizatory otrzymane w wyniku immobilizacji enzymu przetestowano w reakcjach hydrolizy skrobi ziemniaczanej. Enzym unieruchomiony na obu nośnikach był aktywny aż w trzech cyklach reakcji hydrolizy.
4. Dla przeprowadzonych reakcji hydrolizy skrobi ziemniaczanej wyznaczono stałe szybkości reakcji ( $k$ ) oraz wydajność reakcji hydrolizy.
5. Biokatalizator uzyskany w wyniku immobilizacji na nośniku polimerowym z łącznikiem (aldehyd glutarowy) wykazywał większą aktywność we wszystkich trzech cyklach reakcji w porównaniu do enzymu w stanie wolnym.
6. Otrzymane biokatalizatory enzymatyczne mogą być z sukcesem zastosowane w procesach technologicznych w celu obniżenia kosztów hydrolizy skrobi.

## Literatura

1. Wolfgang A., *Enzymes in industry, production and applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 2004, s.140-145.
2. Mateo C., Abian O., *Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment*, *Enzyme Microbial Technology*, 26, 2000, s. 509-515.
3. Sengupta S., Dasgupta M., *Industrial and clinical applications excluding diagnostic clinical enzymology*, Diambil dari National Science Digital, 2006, s. 115-117.
4. Shen C.H., *Quantification and analysis of proteins. diagnostic molecular biology*, Academic Press, 2019, s. 187-214.
5. Garcia M.A.V.T., Garcia C.F., Faraco A.A.G., *Pharmaceutical and biomedical applications of native and modified starch. A Review*, *Starch*, 72, 2020, s. 7-8.
6. BRENDA. Enzyme Information Database, <http://www.Brenda-enzymes.info/>.
7. Basso A., Serban S., *Overview of immobilized enzymes' applications in pharmaceutical, chemical and food industry. Immobilization of enzymes and cells. Methods in molecular biology*, Humana, New York 2020, s.182-189.
8. Bashir N., Sood N., Bandral D.J., *Enzyme immobilization and its applications in food processing. A review*, *International Journal of Chemical Studies*, 8, 2020, s. 254-261.
9. Basso A., Serban S., *Industrial applications of immobilized enzymes. A review*, *Molecular Catalysis*, 479, 2019, s. 479-486.
10. Katchalski-Katzir E. *Immobilized enzymes. Learning From Past Successes and Failures*, *TIB*, 11, 1993, s. 471-478.
11. Górecka E., Jastrzębska M., *Immobilization techniques and biopolimer carriers*, *Biotechnology Food Sci.* 75, 2011, s. 65-86.
12. Liease A., Hilterhaus L., *Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications*, *Chem. Soc. Rev.*, 42, 2013, s. 6236-6249.
13. Wang B., Cheng F., Lu Y., Ge W., Zhang M., Yue B., *Chitosan activated with genipin. A nontoxic natural carrier for tannase immobilization and its application in enhancing biological activities of tea extract*, *J. Mol. Catal. B. Enzym.*, 97, 2013, s. 137-143.
14. Sassolas A., Blum L.J., Leca-Bouvier B.D., *Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors*, *Biotech. Adv.*, 30, 2012, s. 489-511.
15. Guisan J.M., *Methods in biotechnology. Immobilization of enzymes and cells*, Humana Press, New Jersey 2006, s. 185-198.
16. Ansari S.A., Husain Q., *Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials. A review*, *Biotech. Adv.*, 30, 2012, s. 512-523.
17. Yushkova E.D., Nazarova E.A., Matyuhina A.V., Noskova A.O., Shavronskaya D.O., Vinogradov V.V., Skvortsova N.N., Krivoshapkina E.F., *Application of immobilized enzymes in food industry*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67, 2019, s. 11553-11567.
18. Walsh C., *Enzymatic reaction mechanism*, Freeman, San Francisco 1979, s. 123-129.
19. Zdarta J., Meyer A.S., Jesionowski T., Pinelo M., *A general overview of support materials for enzyme immobilization – characteristics, properties, practical utility*, *Catalysts*, 8, 2018, s. 92-98.
20. Zdarta J., Meyer A.S., Jesionowski T., Pinelo M., *Developments in support materials for immobilization of oxidoreductases. A comprehensive review*, *Advances in Colloid and Interface Science*, 258, 2018, s. 1-20.
21. Zanon N.C.M., Oliveira O.N., Caseli L., *Immobilization of uricase enzyme in Langmuir and Langmuir-Blodgett films of fatty acids – possible use as a uric acid sensor*, *J. Colloid Interface Sci.*, 373, 2012, s. 69-74.
22. Lopez-Gallego F., *Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on animated supports*, *J. Biotechnol.*, 119, 2005, s. 70-75.

23. Witek E., *Crosslinking copolymerization of N-vinylformamide in inverse suspension*, *Polymers*, 53, 2008, s. 477-481.
24. Tąta A., Sokołowska K., Świder J., Konieczna-Molenda A., Proniewicz E., Witek E., *Study of cellulolytic enzyme immobilization on copolymers of N-vinylformamide*, *Spectrochimica Acta Part A. Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 149, 2015, s. 494-504.
25. Witek E., Pazdro M., Bortel E., *On the mechanism of base hydrolysis of poly (N-vinylformamide)*, *J. Macromol. Sci. Part A*, 44, 2007, s. 503-507.
26. Sumner J.B., *The estimation of sugar in diabetic urine using dinitrosalicylic acid*, *J. Biol. Chem.*, 62, 1924, s. 287-290.
27. Miller G.L., *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*, *Analytical Chemistry*, 31, 1959, s. 426-428.
28. Konieczna-Molenda A., Kochanowski A., Walaszek A., Bortel E., Tomasiak P., *Immobilization of  $\alpha$ -mylase on poly(vinylamine) and poly(vinylformamide) supports and its performance*, *Chem. Eng. J.*, 146, 2009, s. 5515-5519.
29. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*, *Journal of Biological Chemistry*, 193, 1951, s. 265-275.
30. Shen Y.X., Xiao K., Ling P., Ma Y.W., Huang X., *Improvement on the modified Lowry method against interference of divalent cations in soluble protein measurement*, *Int. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Res.*, 97, 2013, s. 4167-4417.

## **Porównanie hydrolizy skrobi ziemniaczanej z zastosowaniem $\alpha$ -amylazy natywnej i immobilizowanej na nośnikach polimerowych**

### **Streszczenie**

Immobilizacja enzymów na nośnikach polimerowych umożliwia znaczne obniżenie kosztów procesu technologicznego, przede wszystkim dzięki możliwości ponownego ich wykorzystania lub zapewnienia ciągłości procesu. W pracy zaprezentowano badania nad immobilizacją  $\alpha$ -amylazy na nośnikach polimerowych opartych na usieciowanym poli(N-winyloformamidzie), PNVF, aktywowanym lub nie aldehydem glutarowym. Unieruchomiony na nośnikach enzym zastosowano w reakcji hydrolizy skrobi ziemniaczanej. Każdy biokatalizator enzym-nośnik był aktywny w trzech cyklach reakcji hydrolizy. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że unieruchomienie  $\alpha$ -amylazy na nośnikach polimerowych to prosty i tani sposób uzyskania heterogenicznych katalizatorów enzymatycznych posiadających właściwości korzystniejsze niż wolny enzym.

Słowa kluczowe: enzymy, immobilizacja, hydroliza skrobi

## **Comparison of potato starch hydrolysis processes using native $\alpha$ -amylase and immobilized on polymeric carriers**

### **Abstract**

The immobilization of enzymes on a polymer carrier enables a significant reduction of the costs of the technological process, mainly due to the possibility of their re-use or ensuring the continuity of the process. The paper presents studies on the immobilization of  $\alpha$ -amylase on polymeric supports based on cross-linked poly (N-vinylformamide) (PNVF), activated or not with glutaraldehyde. The enzyme immobilized on carriers was used in the hydrolysis reaction of potato starch. Each enzyme-carrier biocatalyst was active in three cycles of the hydrolysis reaction. Based on the obtained results, it was found that immobilization of  $\alpha$ -amylase on polymeric supports is a simple and inexpensive way to obtain heterogeneous enzyme catalysts, possessing properties more favorable than the free enzyme.

Keywords: enzymes, immobilization, starch hydrolysis

## Metabolizm i funkcja ceruloplazminy

### 1. Wprowadzenie

Ceruloplazmina (CP, EC 1.16.3.1) to glikoproteina wiążącą miedź, która jest główną ferroksoydazą w osoczu [1]. Po raz pierwszy została ona wyizolowana z osocza przez Holmberga i Laurella w 1948 roku [2]. Charakteryzuje się tym, że jest to białko zawierające miedź (Cu), wiążące 40-70% tego pierwiastka w osoczu i jest produkowane głównie przez wątrobę [3, 4]. W szczególności jej zakotwiczona w błonie przez glikozylofosfatydyloinozytol (GPI) związana forma CP została zidentyfikowana w komórkach glejowych (ośrodkowy układ nerwowy i siatkówka) oraz komórkach Sertoliego (komórka Sertoliego to wysoka, stożkowata, nieproliferująca komórka kanalikali nasiennego, krętego, w jądrze) [1, 5, 6]. Białko to pochodzi z rodziny oksydaz wielomiedziowych – ewolucyjnie konserwowanej grupy białek, które wykorzystują miedź do sprzężenia utleniania substratów z czteroelektronową redukcją tlenu do wody. Pomimo zapotrzebowania na miedź w funkcjonowaniu ceruloplazminy, białko to nie odgrywa istotnej roli w transporcie czy metabolizmie tego metalu [7].

Dotychczas wykazano wiele fizjologicznych funkcji CP, w tym transport miedzi, regulację homeostazy żelaza, aktywność ferroksoydacyjną, aktywność oksydacyjną amin organicznych i oksydazy askorbinianowej oraz aktywność antyoksydacyjną poprzez przeciwdziałanie powstawaniu wolnych rodników [8]. Chociaż CP posiada właściwości antyoksydacyjne (np. aktywność ferroksoydacyjną), podwyższone stężenie CP w krwiobieg jest związane z chorobami układu sercowo-naczyniowego. Ta ambiwalencja jest prawdopodobnie spowodowana zdolnością CP – za pośrednictwem miedzi – do aktywacji efektów waskulopatii (zaburzeń naczyń krwionośnych w odniesieniu do rąk, nóg lub kończyn, w tym chorób naczyń obwodowych), które obejmują utlenianie lipidów, zmniejszenie bioaktywności tlenu azotu i apoptozę komórek śródbłonna. Z kolei w tych efektach pośredniczy zwiększone tworzenie reaktywnych form tlenu (RFT), takich jak nadtlenki i nadtlenek wodoru. Istnieją również dowody na to, że czynniki ryzyka chorób sercowo-naczyniowych (w szczególności cukrzyca i hiperhomocysteinemia) mogą zwiększać wpływ CP na naczynia krwionośne. Z kolei wydaje się, że RFT zakłócają wiązanie miedzi z CP, upośledzając w ten sposób jej normalną funkcję ochronną, jednocześnie uwalniając miedź, co może sprzyjać patologii oksydacyjnej [9]. Ponadto CP jest zgłaszana jako reaktant ostrej fazy w procesach zapalnych, infekcjach, urazach, cukrzycy i ciąży, co jest głównie przypisywane jej właściwościom antyoksydacyjnym [10-12].

---

<sup>1</sup> natanielstefanowski89@gmail.com, Zakład Zoologii i Fizjologii Zwierząt, Katedra Biologii, Instytut Biologii i Nauk o Ziemi, Akademia Pomorska w Słupsku.

<sup>2</sup> halyna.tkachenko@apsl.edu.pl, Zakład Zoologii i Fizjologii Zwierząt, Katedra Biologii, Instytut Biologii i Nauk o Ziemi, Akademia Pomorska w Słupsku.

<sup>3</sup> natalia.kurhaluk@apsl.edu.pl, Zakład Zoologii i Fizjologii Zwierząt, Katedra Biologii, Instytut Biologii i Nauk o Ziemi, Akademia Pomorska w Słupsku.

Ponadto coraz więcej dowodów wskazuje na to, że nieprawidłowy metabolizm miedzi i żelaza (Fe) jest obserwowany w wielu chorobach neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Wilsona (WD, ang. *Wilson's disease*), aceruloplazminemia, choroba Alzheimera (AD, ang. *Alzheimer's disease*) i choroba Parkinsona (PD, ang. *Parkinson's disease*) [13-16]. Dlatego uzasadniona jest hipoteza, że CP może odgrywać rolę ochronną w wielu chorobach i stanach patologicznych poprzez regulację homeostazy komórkowej Cu i Fe oraz ochronę tkanek przed uszkodzeniem oksydacyjnym. W niniejszym artykule dokonano przeglądu najnowszych ustaleń dotyczących fizjologicznych funkcji CP i omówiono jej rolę w różnych chorobach.

## 2. Struktura i ekspresja CP

Białko CP jest kodowane przez pojedynczy gen [17]. Ludzki gen CP jest zlokalizowany na chromosomie 3q23-q24, koduje go 20 eksonów i zajmuje on około 65 kb DNA [18]. CP jest syntetyzowana w retikulum endoplazmatycznym (ER) hepatocytów jako forma apo-CP (bez Cu) i łączy się z Cu w sieci trans aparatu Golgiego, tworząc holo-CP – formę wiążącą Cu. Następnie CP jest wydzielana do krążenia ogólnego, aby dotrzeć do innych narządów [14]. CP jest szeroko rozpowszechniona w różnych typach eukariontów, w tym ssaków, ryb, roślin i grzybów [19, 20].

Główna forma CP (w osoczu, płynie mózgowo-rdzeniowym i mleku) zawiera 1046 reszt aminokwasowych i ma całkowitą masę około 132 kDa, z czego 120 kDa to białko, a 12 kDa to N-połączone węglowodany. Holo-CP posiada 6 ściśle związanych atomów Cu: po jednym w domenach 2, 4 i 6, pozostałe znajdują się w trójjądrowym klastrze pomiędzy pierwszą i ostatnią domeną [19-23]. Miedź stabilizuje również zwartą trójwymiarową strukturę holo-CP formy, która ma znacznie przestrzenną konformację. Podobnie jak w większości niebieskich oksydaz wielomiedziowych, ligandami Cu są histydyna lub odmiany konformacyjne reszt aminokwasowych histydyny, cysteiny i metioniny. Cu w holo-CP nie uwalnia się z białka w osoczu w warunkach fizjologicznych, a więc musi oddziaływać z innymi białkami lub składnikami powierzchni komórki (lub silnymi czynnikami redukującymi), aby zostać uwolniona. CP jest produkowana głównie przez hepatocyty, gdzie Cu jest wbudowywana w białko w aparacie Golgiego (i ewentualnie endosomach), po dostarczeniu przez białka opiekuńcze (chaperony) ATOX1 do Cu – ATP7B (białko obecne w chorobie Wilsona). Sekrecja CP z komórki odbywa się na drodze egzocytozy. Komórki kilku innych narządów również produkują CP [20, 24, 25, 26, 27], ponadto makrofagi i komórki jednojądrzaste we krwi podczas stanu zapalnego także produkują CP [19, 28, 29].

W komórce co najmniej dwie formy CP są poddawane procesowi ekspresji. Jedna forma znajduje się na powierzchni komórki, połączona z błoną przez GPI. W tym przypadku alternatywny splicing eksonów 19 i 20 na C-końcu transkryptu skutkuje dodaniem 30 alternatywnych aminokwasów, które zastępują ostatnie 5 w formie CP z osocza, co oznacza wiązanie z GPI [1, 30]. Forma CP związana z GPI została po raz pierwszy odkryta w mózgu – związana z astrocytami [1] i komórkami glejowymi [31, 32]. Są dowody na to, że znacząca ekspresja CP odbywa się w błonach śledziony i nerek, w mniejszym stopniu – w sercu i wątrobie. Forma GPI-CP znajduje się również na powierzchni komórek Sertoliego w jądrze [5], komórek oponowych ośrodkowego układu nerwowego [33] oraz w komórkach odpornościowych (limfocyty, monocyty i makrofagi), gdzie jest związana z tratwami lipidowymi i ferroportyną [28, 29].



Przyjmuje się, że forma CP związana z GPI zawiera również 6 atomów Cu. Dodatkowa forma CP, dłuższa o 4 aminokwasy, ulega selektywnej ekspresji w łożysku [34]. Rola tych alternatywnych form CP pozostaje do zbadania. Warto zaznaczyć, że CP krążąca we krwi występuje nie tylko w formie holo-CP (z sześcioma atomami miedzi). Rzeczywiście, testy immunologiczne sugerują, że aż 50% (lub więcej) może być w formie apo-CP [35, 36, 37]. Wydaje się, że część apo-CP jest wydzielana wraz z holo-CP przez hepatocyty i jest główną formą wydzielaną przy niedoborze miedzi [38]. Apo-CP forma jest również wytwarzana podczas transferu miedzi z holo-CP do komórek. We krwi apo-CP ulega szybszej przemianie niż holo-CP, usuwana prawdopodobnie głównie przez hepatocyty za pośrednictwem receptora galaktozy [21].

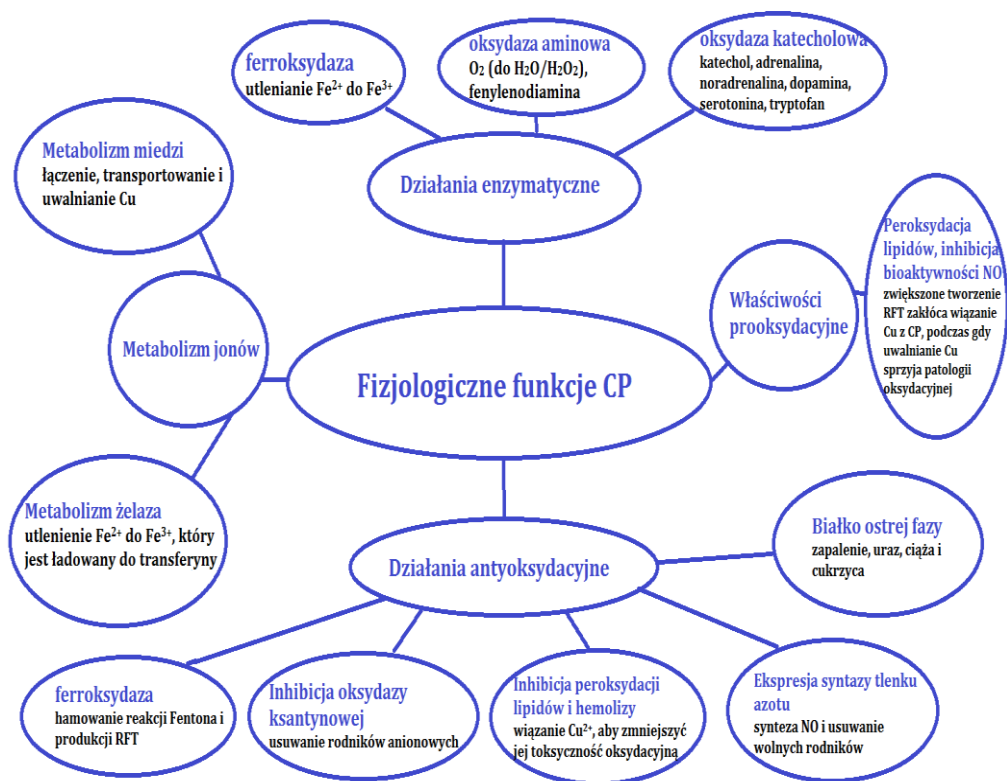
Poziom krążącej w osoczu CP u dorosłych ludzi (w normie) wynosi około 300 mg/L, a około 10% całości jest wykrywana jako forma apo-CP, która jest niestabilna, nie posiada aktywności enzymatycznej i jest szybko katabolizowana z okresem półtrwania wynoszącym około pięciu godzin [7]. Aktywność i poziom CP zależy od kilku głównych czynników, w tym od niedoboru miedzi, cytokin zapalnych oraz estrogenów i progestagenów [39, 40, 41].

### **3. Rola CP w metabolizmie ssaków**

CP jest jednym z najlepszych przykładów białka wielofunkcyjnego (rys. 1). Rzeczywiście – Bielli i Calabrese (2002) nazwali je „białkiem księżycowym” (nie bez powodu) [20, 42]. Wszystkie ustalone i udokumentowane funkcje CP opierają się na fakcie, że zawiera ona i przenosi miedź – jako jedną z znanych funkcje CP w formie holo-CP (rys. 1). Nie zostało do końca zbadane, czy występująca równolegle forma apo-CP w osoczu odgrywa jakąś niezależną rolę w metabolizmie miedzi u ssaków [17, 43, 44]. Większość efektów holo-CP formy ma charakter enzymatyczny, polegający na absorbowaniu i przenoszeniu elektronów z różnych substratów na tlen. Kilka typów substratów ma odrębne miejsca wiązania na cząsteczce CP [20, 22, 23].

#### **3.1. Aktywność ferroksoydacyjna CP i metabolizm żelaza**

CP jest najbardziej znana ze swojej zdolności do utleniania  $Fe^{2+}$  do  $Fe^{3+}$  (ferroksoydacja) i jest główną ferroksoydazą w osoczu krwi [45, 46]. Ogólnie przyjmuje się, że zdolność CP do utleniania żelaza ułatwia uwalnianie tego metalu z komórek i umożliwia wiązanie żelaza z transferyną w płynie pozakomórkowym i we krwi. Rola CP w tym procesie została pierwotnie wskazana przez badania z udziałem świń z niedoborem miedzi [47] i psów [48], podczas gdy u innych ssaków poziomy CP-Cu we krwi były niskie, a nagromadzenie żelaza miało miejsce w wątrobie i niektórych innych tkankach. Następnie grupa Friedena odkryła, że CP posiada aktywność ferroksoydazy [49]; później wykazano, że główną cechą patologiczną genetycznego niedoboru CP (aceruloplazminemia), wykrytego u ludzi i replikowanego u myszy, jest nadmierna akumulacja żelaza w komórkach wątroby, mózgu i trzustki [15, 46, 50]. Tak więc istnieją istotne dowody, że enzymatycznie aktywna CP zwiększa odpływ żelaza z wątroby, a być może także z komórek w innych tkankach takich jak mózg i trzustka, jak również makrofagów, szczególnie w warunkach hipoksji [51].



Rysunek. 1. Fizjologiczne działanie CP [opracowanie własne]

Uważa się, że tego rodzaju rolę odgrywa również forma CP związana z GPI. Badania nad skutkami akumulacji żelaza w mózgu w aceruloplazminemii również potwierdzają tę koncepcję [15, 52], podobnie jak badania z makrofagami, w których forma GPI-CP była lokalizowana z ferroportyną w tratwach lipidowych w obrębie błony plazmatycznej [29]. Co więcej, ekspresja tej formy CP była zwiększona po ekspozycji makrofagów (ale nie hepatocytów) na nitylotrioctanie żelaza w stężeniu 50-200  $\mu\text{M}$ . Jeśli chodzi o etapy związane z pośredniczeniem w wypływie żelaza, uważa się, że żelazo uwalniane z komórek przez eksporter ferroportynę jest w stanie  $\text{Fe}^{2+}$ ; a utlenianie przez CP pozwala żelazu związać się z jego zewnątrzkomórkowym i nośnikowym białkiem osocza – transferyną, która wiąże  $\text{Fe}^{3+}$  [53]. Rzeczywiście, fizyczna interakcja pomiędzy CP a transferyną została wykazana w badaniach *in vitro* i poprzez modelowanie [54]. Ostatnio udało się wyjaśnić etapy transferu elektronów i żelaza pomiędzy nimi. W warunkach beztlenowych *in vitro*, Eid i wsp. (2014) zmieszali CP, transferynę i  $\text{Fe}^{2+}$  i, wykorzystując techniki spektrofotometryczne oraz uwalniania chemicznego, obserwowali przepływ elektronów (z  $\text{Fe}^{2+}$ ) w obrębie atomów miedzi w CP [55]. Pokazało to, że Fe jest najpierw utleniane i przenoszone do dwóch „miejsz uchwytu” na CP w kompleksie di-transferyna-CP i że oba jony  $\text{Fe}^{3+}$  następnie przemieszczają się do C-końcowych miejsc dwóch cząsteczek transferyny, powodując zmiany konformacyjne, które następnie uwalniają je jako dwie monoferyczne cząsteczki transferyny. Zgodnie

z tym – Sarkar i wsp. (2003) wykazali, że forma holo-CP stymuluje odpływ żelaza z komórek makrofagów i wiązanie ich z apotransferyną, ale tylko w warunkach niedo-tlenienia [51].

Chociaż w osoczu krwi generalnie nie panują warunki beztlenowe, tego rodzaju badania przekonują, że taka seria zdarzeń może mieć miejsce. Jednocześnie, pytania o względne znaczenie tej funkcji CP pozostają bez odpowiedzi. Na przykład: dlaczego uwalnianie żelaza przez CP wydaje się być tkankowo-selektywne? Pośrednictwo CP w odpływie żelaza wydaje się być istotne dla wątroby [15, 56] i prawdopodobnie dla makrofagów [51], ale nie dla enterocytów zaangażowanych we wchłanianie żelaza w układzie pokarmowym [57], gdzie rolę tę wydaje się pełnić ferrokso-daza i hefajstyna [58-60]. Hefajstyna jest bliskim „kuzynem” CP i ma podobną strukturę, z tą różnicą, że jest związana z błoną plazmatyczną (i wewnętrznymi pęcherzykami) przez domenę transmembranową na C-końcu jednostki podobnej do CP [58, 61, 62]. Inaktywacja hefajstyny prowadzi do zatrzymania żelaza przez enterocyt i powoduje niedobór żelaza. Ponadto grupa Aisena doniosła, że transferyna sama w sobie ma aktywność ferrokso-dazy [59, 63, 64], więc inna ferrokso-daza (jak CP lub hefajstyna) może nie być potrzebna. Inną potencjalną anomalią jest to, że zwiększone poziomy CP nie korelują z większym tempem odpływu żelaza do krwi; w rzeczywistości odwrotnie jest w zapaleniu, gdzie poziomy enzymatycznie aktywnej CP wzrastają, ale poziomy żelaza transportowanego w transferynie spadają [65, 66].

### 3.2. Utlenianie hormonów przez CP

Inną znaną aktywnością CP jest zdolność do utleniania różnych amin biogennych. Wiązanie tych substratów zachodzi w innym miejscu enzymu niż wiązanie żelaza. Pomiar aktywności enzymu CP poprzez utlenianie syntetycznych substratów zawierających aminy (takich jak p-fenylenodiamina i o-dianizydyna) jest standardową procedurą identyfikacji i ilościowego oznaczania CP, i – przynajmniej w przypadku ludzkiej CP – aktywność ta (podobnie jak aktywność ferrokso-dazy) jest całkowicie hamowana przez azydek. *In vivo* najbardziej prawdopodobnymi fizjologicznymi substratami dla CP są dopamina, 5-OH tryptamina (serotonina), adrenalina i noradrenalina [67], ale nie histamina (choć histamina wiąże się do CP) [68]. Aminy te są hormonami lub prekursorami hormonów, a utlenianie powoduje ich dezaktywację. Ponieważ wszystkie sygnały hormonalne muszą być szybko eliminowane, aby zapobiec długotrwałym nieregulowanym skutkom, wydaje się prawdopodobne, że CP przyczynia się do inaktywacji tych naturalnych bioaktywnych amin. Jednak CP nie jest jedynym zaangażowanym enzymem. W osoczu występują inne zależne od miedzi oksydazy aminowe i diaminowe, w tym jedna, która utlenia histaminę [69-72].

### 3.3. Obrona antyoksydacyjna

CP jest jednym z głównych zewnątrzkomórkowych „zmiataczy” wolnych rodników. Jej zdolność do hamowania lub niwelowania skutków działania RFT wykazano dawno temu w badaniach *in vitro* z oczyszczoną CP – głównie przez grupy Goldsteina i Gutteridge [73-75]. Wykazano, że CP hamuje szereg reakcji utleniania, w których biorą udział nadtlenki i ponadtlenki, w tym reakcję Fentona, która tworzy rodnik hydroksylowy ( $\text{OH}\cdot$ ) z  $\text{H}_2\text{O}_2$  oraz dysmutację ponadtlenków [21]. Liczne badania wykazały również specyficzne hamowanie przez CP uszkodzeń biomolekuł, takich jak

tworzenie cukru prostego z grupy aldopentoz, jakim jest deoksyryboza indukowana przez rodniki hydroksylowe i ponadtlenkowe [75], a także wiele innych. Tak więc już w latach 80. ubiegłego wieku CP była postrzegana jako neutralizator RFT, zdolny do przejmowania dodatkowych elektronów i przekazywania ich na  $O_2$  w celu utworzenia wody. Nowsze badania dotyczące zdolności CP do neutralizacji rodników są trudne do znalezienia, częściowo dlatego, że rola CP jako ferrokasydazy przysłoniła specyfikę jej innych funkcji. Względny lub absolutny brak CP (albo w krążeniu, albo cząsteczek związanych z powierzchnią przez GPI) powoduje akumulację żelaza w niektórych komórkach; obfitość żelaza może zwiększyć generowanie RFT i powodować uszkodzenie biomolekuł i śmierć komórki, dlatego obecność CP najprawdopodobniej mogłaby zapobiegać również radykalnym uszkodzeniom w komórce. Rzeczywiście, pacjenci nie wykazujący ekspresji CP (aceruloplazminemia) mają zwiększoną peroksydację lipidów w częściach mózgu związanych z akumulacją żelaza (jądro ogoniaste i skorupa) [76], jak również w korze mózgowej i mózdkowej [77].

Jednak drugim powodem powstałych uszkodzeń w aceruloplazminemii byłby brak funkcji antyoksydacyjnej CP, aby poradzić sobie z rodnikami i zapobiec uszkodzeniu komórek. Zgodnie z tymi poglądami niską aktywność CP (ale bez aceruloplazminemii) i poziom tego białka w płynie mózgowo-rdzeniowym stwierdza się w chorobie Parkinsona, gdzie żelazo gromadzi się w istocie czarnej i uszkadza ją [78]. Co ciekawe, pacjenci z chorobą Parkinsona mają również niższy poziom CP w osoczu krwi [79]. Przyczyny mniejszej ekspresji CP u pacjentów z chorobą Parkinsona (zarówno w mózgu, jak i we krwi) pozostają nadal do wyjaśnienia [4].

### 3.4. CP jako krążące źródło miedzi dla komórek

Chociaż miedź w formie holo-CP w osoczu i innych płynach jest zakotwiczona w swojej strukturze i nie może być dializowana w normalnych warunkach fizjologicznych, od dawna istnieją dowody na to, że miedź w CP jest dostarczana do komórek w wielu tkankach [80-82]. Rzeczywiście, niektóre tkanki (takie jak łożysko i serce) preferują formę CP-Cu, w odróżnieniu od tych związanych z albuminą i transkupreinalub makroglobuliną [81, 83]. Ostatnie prace, w których zastosowano hodowane komórki ludzkie i mysie inkubowane odpowiednio z oczyszczoną ludzką i mysią CP, znakowane radioizotopem Cu, potwierdziły i rozszerzyły te badania [62, 84]. Badania wykazały, że transfer miedzi z CP do komórek zachodzi na powierzchni komórki i podczas inkubacji z komórkami (ale nie bez komórek) forma holo-CP zostaje przekształcona w apoformę, bez zmiany całkowitej ilości CP (określonej metodą Western blot) [63, 84]. Tak więc chociaż inne białka mogą dostarczać miedź do komórek [85] i zastępować CP, ponieważ ludzie i zwierzęta z aceruloplazminemią nie cierpią na oczywiste niedobory miedzi [86], CP jest ważnym źródłem tego pierwiastka dla komórek.

## 4. Regulacja ekspresji CP

Głównymi czynnikami determinującymi poziom CP w osoczu krwi są cytokiny zapalne, estrogeny i progestageny oraz niedobór miedzi [4, 21]. CP jest bardzo wrażliwa na niedobór miedzi. Jej aktywność (zależna od miedzi) i ilość spadają, gdy spożycie miedzi w diecie jest niskie. Pomiar aktywności CP mogą zatem pomóc zdiagnozować niedobór miedzi w organizmie. Niedotlenienie i anoksja mogą również odgrywać rolę, przynajmniej w niektórych stanach patologicznych. Jako reagent ostrej fazy u wszystkich

badanych gatunków, poziom CP w osoczu krwi wzrasta, gdy układ odpornościowy reaguje na infekcje i stany zapalne. Reakcje zapalne są w dużej mierze pośredniczone przez cytokiny, a specyficzne odpowiedzi CP osocza na interleukinę 1 (IL-1, ang. *interleukin 1*), interleukinę 6 (IL-6, ang. *interleukin 6*) i czynnik martwicy nowotworów (TNF- $\alpha$ , ang. *tumor necrosis factor  $\alpha$* ) zostały zarejestrowane u królików i na hodowanych ludzkich komórkach wątrobiaka już dawno temu [41].

Wątroba jest głównym organem odpowiedzialnym za zmiany w stężeniu białek osocza towarzyszące odpowiedzi ostrej fazy; jest organem, z którego pochodzi większość białek krążących we krwi. CP należy do grupy białek pozytywnie reagujących na stany zapalne i infekcje (tzn. zwiększa się jej synteza i wydzielanie). Inne białka odpowiedzi pozytywnej w reakcjach zapalnych zaangażowane w metabolizm miedzi i żelaza to ferrytyna surowicy i czynnik krzepnięcia VIII. Do „ujemnych” białek ostrej fazy związanych z miedzią i żelazem należą albumina (najbardziej dotknięta pod względem ilości białka) i transferyna. Wszystkie te zmiany skutkują zmniejszonym transportem żelaza i zwiększonym poziomem miedzi w osoczu podczas ostrej fazy procesu zapalnego. Jak wspomniano wcześniej, wzrost produkcji CP w ostrej fazie występuje w połączeniu ze zmniejszonym (a nie zwiększonym) odpływem żelaza z komórek, głównie wątroby, śledziony i błony śluzowej jelit, w czym pośredniczy przede wszystkim zwiększone uwalnianie hormonu hepcydyny z wątroby. Hepcydyna nasila degradację ferroportyny, zmniejszając jej rozmieszczenie na powierzchni komórek [87]. Wynikające z tego zmniejszenie odpływu żelaza z tych głównych tkanek zatrzymujące żelazo, które jest również dostarczane z pożywieniem, powoduje akumulację tego pierwiastka. Przykładowo: w ostatnich badaniach przeprowadzonych przez Naz i wsp. (2012) u szczurów i myszy, którym wstrzyknięto terpentynę w celu wywołania odpowiedzi ostrej fazy, odnotowano zwiększone poziomy mRNA i białek wątrobowych, tj. hepcydyny, transferyny i receptora transferyny (jak również transporteru metalu dwuwartościowego 1, DMT1, z ang. *N, N-dimethyltryptamine 1*) oraz zmniejszone poziomy mRNA i białek dla izoform ferroportyny (jak również białka hemochromatozy HFE, hemojuweliny i hefajstyny), z których wszystkie korelowały ze zwiększonym całkowitym, cytozolowym i jądrowym stężeniem żelaza [88]. W śledzienie stwierdzono również zwiększoną ekspresję hepcydyny i zmniejszoną ekspresję ferroportyny. Podawanie myszom IL-6, IL-1b i TNF- $\alpha$  spowodowało podobne efekty, a zmiany te były zahamowane (choć nie nieobecne) u myszy z nokautem genu IL-6 [89-92]. Nie tylko aktywność ferroportyny była zmniejszona w odpowiedzi ostrej fazy, ale także wzrastał komórkowy wychwyt żelaza, jak wykazano m. in. w hodowlach pierwotnych hepatocytów reagujących na te same cytokiny, w tym szczególnie na IL-6 [42, 93, 94]. IL-6 wydaje się główną cytokiną odpowiedzialną za zmiany w transporcie żelaza i regulację stężenia CP w ostrej fazie procesu zapalnego [95, 96, 97]. Istnieją 3 elementy odpowiedzi na IL-6 w regionach wzmacniacza transkrypcji i promotora genu CP, a szlak odpowiedzi na IL-6 (która zachodzi poprzez receptory niereceptorowej kinazy tyrozynowej) angażuje białko widelkowe O1 (FOXO1, ang. *forkhead box protein 1*), przynajmniej w hepatocytach [98, 99, 100, 101].

## 5. CP w chorobach neurodegeneracyjnych

### 5.1. Choroba Wilsona

Choroba Wilsona (WD) jest dziedziczną autosomalnie recesywnie chorobą zaburzeń metabolizmu Cu i została po raz pierwszy zdefiniowana w 1912 roku. Głównymi cechami klinicznymi WD są: dysfunkcja wątroby oraz deficyty neurologiczne objawiające się dystonią i parkinsonizmem [102]. WD charakteryzuje się szkodliwą akumulacją miedzi w wątrobie i mózgu. Jest to jedno z tych rzadkich zaburzeń genetycznych, które potrzebują skutecznego i trwającego całe życie leczenia, które radykalnie zmieniło rokowanie w tej chorobie [103]. WD jest zwykle podejrzewane, gdy stężenie CP i miedzi w surowicy jest niskie, a 24-godzinne wydalanie miedzi z moczem jest podwyższone [104].

Obecnie uważa się, że wykrywanie mutacji w genie ATP7B (ATPaza typu P) przyczynia się do rozpoznania WD. Do tej pory zidentyfikowano ponad 500 mutacji, przy czym nie stwierdzono wyraźnej korelacji między genotypem a fenotypem [104, 105]. Pojawia się coraz więcej dowodów na to, że WD może być znacznie bardziej powszechna niż wcześniej szacowano [106, 107]. Różny poziom ekspresji ATP7B stwierdzono w wątrobie, nerkach, łożysku i mózgu [108]. W mózgu ATP7B ulega ekspresji głównie w splocie naczyniówkowym, zwojach podstawnych, mózdzku i korze mózgowej [109]. ATP7B odgrywa rolę w transporcie Cu do sieci trans aparatu Golgiego (TGN), gdzie Cu jest włączana do CP, a także bierze udział w wydalaniu Cu z żółcią. Do ważnych procesów transportu Cu należy wiązanie Cu do białka Atox1 (ang. *antioxidant 1 copper chaperone*) w cytozolu i przemieszczanie do TGN, gdzie Cu jest wbudowywana do CP przy udziale ATP7B [107]. Mutacja genu ATP7B skutkuje upośledzeniem wydalania Cu i nadmiarem magazynowania Cu w tkankach, co prowadzi do szeregu szkodliwych reakcji, zwłaszcza stresu oksydacyjnego, który może uszkadzać komórki [110, 111].

Akumulacja wolnej Cu (nie związanej z CP) jest główną cechą patologiczną choroby Wilsona. Niskie poziomy CP powodują wyższe wartości wolnej miedzi ( $> 1,6$  mM) w krążeniu ogólnym, co powoduje uszkodzenie tkanek i stres oksydacyjny również w mózgu (np. obecność pierścienia Keizera-Fleischera). W astrocytach mózgu akumulacja Cu prowadzi do upośledzenia bariery krew-mózg, a w konsekwencji – do uszkodzenia neuronów i oligodendrocytów [112]. Ponadto dysfunkcja ATP7B w astrocytach może powodować upośledzenie produkcji formy holo-CP, czego konsekwencją jest obniżona aktywność ferrokasydazy i upośledzony odpływ Fe [113-115].

W badaniu PET wykazano zwiększony wychwyty znakowanego radioaktywnie Fe u pacjentów z WD w porównaniu ze zdrowymi ochotnikami [116]. Na uwagę zasługuje fakt, że akumulacja żelaza może być wynikiem niskiego poziomu CP u pacjentów z WD, u których poziom CP był niższy niż 5% wartości w normie [117, 118]. Dodatkowe badania ATP7B (-/-) z udziałem myszy wykazały, że nie doszło do akumulacji Cu w mózgu, a zatrucie Cu nie spowodowało akumulacji Fe w mózgu lub wątrobie myszy [119, 120]. Wszystkie te badania pośrednio sugerują, że na zaburzony metabolizm Fe u osób z WD ma wpływ obniżony poziom CP, a nie akumulacja Cu. Ogólnie rzecz biorąc, oprócz Cu, akumulacja innych metali u osób z WD pozostaje niejasna, ale istnieją dowody, że zarówno Fe, jak i Mn mogą powodować neurodegenerację [121]. Konieczne są dalsze badania w celu poznania dokładnej roli CP u osób z WD.

## 5.2. Neurodegeneracja z akumulacją żelaza w mózgu

Neurodegeneracja z akumulacją żelaza w mózgu (NBIA, ang. *neurodegeneration with brain iron accumulation*) stanowi niejednorodną i złożoną grupę dziedzicznych chorób neurodegeneracyjnych charakteryzujących się nadmierną akumulacją żelaza, szczególnie w jądrach podstawnych. Typowe cechy kliniczne NBIA obejmują zaburzenia ruchu, zwłaszcza parkinsonizm i dystonię, zaburzenia funkcji poznawczych, objawy piramidalne i nieprawidłowości siatkówki. Opisane do tej pory formy NBIA obejmują m.in. neurodegenerację związaną z kinazą pantotenową (PKAN, ang. *pantothenase kinase-associated neurodegeneration*), neurodegenerację związaną z fosfolipazą A2 (PLAN, ang. *phospholipase A2 associated neurodegeneration*), neuroferrytynopatię, aceruloplazminemię, neurodegenerację związaną z białkiem beta-propellerowym (BPAN, ang. *beta-propeller protein-associated neurodegeneration*) [122].

Miejsce akumulacji żelaza znajduje się głównie w jądrach podstawy, a konkretnie w gałce bladej (łac. *globus pallidus*) i istocie czarnej (łac. *substantia nigra*). Charakterystycznymi objawami klinicznymi są zaburzenia ruchowe, spastyczność i zaburzenia poznawcze [123]. Dotychczas zidentyfikowano dziesięć mutacji genów związanych z NBIA, w tym mutacji genów CP, łańcucha lekkiego ferrytyny (FTL, ang. *ferritin light chain*), kinazy pantotenowej 2 (PANK2, ang. *pantothenate kinase 2*), grupy 6 fosfolipazy A2 (PLA2G6, ang. *Phospholipase A2 group 6*) itd. Mechanizmy molekularne tych chorób genetycznych są pozornie niepowiązane, ale zarówno CP, jak i FTL są bezpośrednio zaangażowane w homeostazę żelaza [124].

## 5.3. Aceruloplazminemia

Aceruloplazminemia, należąca do grupy NBIA, jest chorobą dziedziczną autosomalnie recesywnie, spowodowaną mutacją w genie CP. Jest to typowa choroba ukazująca związek między odkładaniem się żelaza a neurodegeneracją, co pomaga zrozumieć rolę CP w OUN. Objawy neurologiczne tej choroby obejmują skurcz błon śluzowych nosa, dystonię żuchwy, płasawicę, dyzartrię, ataksję, parkinsonizm i zaburzenia funkcji poznawczych [125]. Wyniki badań patologicznych w mózgu pacjentów wykazały oczywistą akumulację żelaza zarówno w astrocytach, jak i neuronach, a zmiany neurodegeneracyjne zostały stwierdzone w korze mózgowej, zwojach podstawy, jak również jądrach zębatych i korze mózdzku [126].

Badania nad patogenezą molekularną w aceruloplazminemii prowadzono, analizując komórki ssaków i modele mysie charakteryzujące się mutacjami genu CP [127-129]. Dotychczas proponowane molekularne mechanizmy uszkodzenia nerwów przez akumulację żelaza przypisywane są działaniu RFT i stresowi oksydacyjnemu [130, 131]. W przypadku braku aktywności CP,  $Fe^{2+}$  nie może być utlenione i gromadzi się znacząco w obrębie astrocytów, co obserwuje się w patologii aceruloplazminemii [132]. Jednocześnie w tkankach mózgowych i płynie mózgowym odnotowano wyraźny wzrost markerów stresu oksydacyjnego, w tym wzmószoną peroksydację lipidów i oksydacyjne modyfikacje białek w odpowiedzi na nadmierną toksyczność żelaza [133, 134]. Model z niedoborem CP wykazał, że utrata komórek neuronalnych może wynikać z braku żelaza w regionach mózgu, w których żelazo w astrocytach nie jest skutecznie mobilizowane do wychwytu przez neurony, a nadmierne nagromadzenie żelaza w astrocytach może również skutkować uszkodzeniem oksydacyjnym tych komórek, z następczą utratą czynników wzrostu pochodzenia glicyjowego, krytycznych dla neuronów [27]. Uszkodzenie komórek neuronalnych może wynikać z niedoboru żelaza już we wczesnym stadium [15].

## 5.4. Choroba Alzheimerera

Choroba Alzheimerera jest najczęstszą postacią neurodegeneracji u dorosłych i charakteryzuje się postępującą utratą funkcji poznawczych prowadzącą do śmierci. Do cech charakterystycznych tej neuropatologii należą gromadzenie się pozakomórkowych blaszek amyloidowych w dotkniętych chorobą regionach mózgu, tworzenie wewnątrz-neuronalnych splątków neurofibrylarnych, przewlekły stan zapalny, stres oksydacyjny oraz nieprawidłowa homeostaza biometali [135]. AD charakteryzuje się postępującą neurodegeneracją związaną z odkładaniem się blaszek starczych (SPs, ang. *senile plaques*) i splątków neurofibrylarnych (NFTs, ang. *neurofibrillary tangles*) w mózgu [136, 137]. Chociaż mechanizmy rozwoju AD są wciąż dyskutowane, dowody potwierdzają, że metale takie jak Cu, Fe, Zn i Mg są zaangażowane w procesy odkładania amyloidu- $\beta$  ( $A\beta$ , ang. *amyloid- $\beta$* ) w blaszkach i włączania fosforylowanego białka tau do splątków neurofibrylarnych [138, 139]. Jony metali mogą nie tylko powodować stres oksydacyjny, neurotoksyczność i apoptozę, ale także indukować neurogenezę i plastyczność synaptyczną. Jeśli mechanizm równoważenia jonów metali zostanie zaburzony, może doprowadzić to do rozwoju AD [140]. Jak już wspomniano, Cu i CP zostały implikowane w patogenezie zarówno AD, jak i PD [141]. W kilku badaniach stwierdzono, że deregulacja metabolizmu Cu przyczynia się do rozwoju tych szlaków patogenetycznych i może być czynnikiem ryzyka przyspieszającym kaskadę chorób [142, 143]. Noda i wsp. (2013) wykazali, że Cu nasila dimeryzację białka prekursorowego amyloidu (APP, ang. *amyloid precursor protein*) i zwiększa zewnątrzkomórkowe uwalnianie  $A\beta$ . Z drugiej strony, D-penicylamina, chelator Cu, hamowała powyższy proces [144]. Ponadto, w niektórych metaanalizach wykazano wzrost poziomu wolnej Cu (nie związanej z CP) w surowicy i płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów z AD [145, 146]. Zgodnie z tym, w badaniu podłużnym u pacjentów z AD wykazano, że wyższe poziomy wolnej Cu w surowicy korelują z niekorzystną ewolucją funkcji poznawczych [146].

Oprócz Cu w patogenezie AD szeroko badany jest również poziom żelaza. Zwiększone stężenie żelaza odnotowano w korze mózgowej i mózdzku u osób z przedkliniczną postacią AD i łagodnymi zaburzeniami poznawczymi [147]. Dyskutowano o tym, że żelazo może mieć bezpośredni wpływ na powstawanie blaszek miażdżycowych poprzez wpływ na APP. Żelazo może wiązać się z  $A\beta$  i białkiem tau, aby indukować agregację  $A\beta$  i hiperfosforylację białka tau, zwiększając toksyczność dla neuronów [148, 149]. Wiadomo teraz, że CP odgrywa zasadniczą rolę w homeostazie Cu i żelaza, natomiast kwestia, czy CP działa jako czynnik ochronny w rozwoju AD pozostaje jeszcze do ustalenia [150-152]. Co ciekawe, pojawiają się dowody na istnienie genetycznego ryzyka zachorowania na AD związanego z allelami ATP7B, gdy w krążeniu ogólnym wzrasta poziom formy apo-CP [153-155]. Wyniki te sugerują, że CP może odgrywać rolę ochronną w chorobach neurodegeneracyjnych [121].

## 5.5. Choroba Parkinsona

Choroba Parkinsona jest drugą co do częstości występowania chorobą neurodegeneracyjną po AD [156]. Klinicznie zaburzenie to charakteryzuje się głównie czterema objawami motorycznymi: drżeniem spoczynkowym, sztywnością, spowolnieniem ruchowym i niestabilnością postawy [157], chociaż w ostatnich latach coraz bardziej podkreśla się znaczenie cech pozamotorycznych w PD, takich jak depresja i zaburzenia snu [158]. Patologicznie PD charakteryzuje się postępującą utratą neuronów dopami-



nergicznych w istocie czarnej (SN, łac. *substantia nigra*), którą uważa się za odpowiedzialną za objawy ruchowe choroby. Dodatkowo wykazano, że inkluzje białkowe zwane ciałami Lewy'ego, występujące w różnych obszarach mózgu pacjentów z PD, pojawiają się przed utratą neuronów dopaminergicznych [159]. Chociaż mechanizmy leżące u podstaw patofizjologii PD nie zostały w pełni zrozumiane, coraz więcej dowodów sugeruje, że stan zapalny i stres oksydacyjny odgrywają kluczową rolę w kaskadzie zdarzeń prowadzących do degeneracji neuronów dopaminergicznych [160, 161]. Za udziałem reakcji zapalnej w przebiegu PD przemawia aktywacja komórek mikrogleju i reaktywna astroglia w mózgach pacjentów z PD [162-164].

Stopniowo zaczęto zwracać uwagę na możliwość, że zaburzenia homeostazy jonów metali odgrywają rolę w PD [165, 166]. Ostatnie badania sugerują, że poziom wolnej Cu koreluje z nasilonym stresem oksydacyjnym, oligomeryzacją alfa-synukleiny i tworzeniem ciał Lewy'ego w PD. Obniżenie poziomu CP-Cu może sprzyjać akumulacji żelaza i związanej z tym aktywacją stresu oksydacyjnego [167, 168]. Niektóre badania wskazują na niską aktywność CP w płynie mózgowo-rdzeniowym i akumulację żelaza w SN w przebiegu PD, a szczególnie u pacjentów z genotypem AT wariantu rs707753 genu CP (co odpowiada zmianie w białku D544E) [78, 169]. Dysfunkcje CP w PD zostały również udokumentowane w innych badaniach. Stwierdzono, że obniżona aktywność ferrokasydazy była związana z wcześniejszym początkiem choroby i markerami odkładania żelaza w SN pacjentów z PD [170]. Zgodnie z tym wykazano około 80% utratę aktywności ferrokasydacyjnej CP w SN pacjentów z PD [14]. W szczególności badanie przeprowadzone na mysim modelu PD wykazało, że obwodowa infuzja CP może zmniejszyć neurodegenerację i akumulację żelaza w rdzeniu kręgowym [171]. Johannesson i wsp. (2012) sugerują, że stężenie CP i jej aktywność oksydacyjna są znacząco obniżone przy akumulacji żelaza w SN i zwojach podstawy. Poprzez indukowanie syntezy neuromelaniny CP może chronić neurony w SN [172]. Tym samym regulacja poziomu CP może być potencjalną terapią modyfikującą przebieg PD [173]. Grolez i wsp. (2015) wykazali, że większość pacjentów leczonych deferipronem (chelatorem żelaza) wykazywała poprawę kliniczną i radiologiczną, przy czym pacjenci z niższą aktywnością CP wydawali się lepiej odpowiadać na chelatację żelaza [78]. Niemniej jednak potrzebne są obecnie dalsze badania prowadzone na dużych grupach pacjentów, aby ustalić, czy farmakologiczna modulacja aktywności CP może być innowacyjną strategią neuroprotekcijną w PD i czy polimorfizm genu D544E CP jest odpowiednim biomarkerem w diagnostyce PD. Ponadto obserwowane właściwości prooksydacyjne CP w przebiegu PD sugerują, że podejście terapeutyczne oparte na CP u ludzi może nie być skuteczne [174].

Ze względu na złożony genotyp i fenotyp u pacjentów z PD, a także różne mechanizmy upośledzenia aktywności ferrokasydacyjnej CP, obecnie nie wiadomo, czy potencjalna strategia terapeutyczna CP jest trafna. Podobnie jak PD, stwardnienie zanikowe boczne (ALS, ang. *amyotrophic lateral sclerosis*), inna śmiertelna choroba neurodegeneracyjna, ma tę samą charakterystyczną cechę: selektywną – utratę neuronów. Mechanizmy tej utraty pozostają nieznane, a badania dotyczące roli CP w ALS są ubogie. Conti i wsp. (2008) zasugerowali, że istnieje upośledzenie funkcji CP w płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów z ALS w porównaniu z grupą kontrolną (poprzez ocenę jej aktywności ferrokasydacyjnej) [175]. Podsumowując, poprzednie badania wykazały, że CP może odgrywać rolę ochronną w chorobach neurodegeneracyjnych poprzez swoje liczne funkcje, ale mechanizmy patofizjologiczne pozostają niejasne i konieczne są dalsze badania.

## 5.6. Ceruloplazmina w chorobie wieńcowej serca

Choroby układu krążenia (CVD, ang. *cardio-vascular diseases*) są najczęstszą przyczyną zgonów na świecie w krajach rozwiniętych. Jako kategoria diagnostyczna, CVD obejmuje różne jednostki chorobowe: chorobę wieńcową (CHD, ang. *coronary heart disease*), objawiającą się zawałem serca (MI, ang. *myocardial infarction*) lub dusznicą bolesną; chorobę naczyniowo-mózgową, objawiającą się udarem mózgu i przemijającym atakiem niedokrwinnym; nadciśnienie tętnicze; chorobę tętnic obwodowych oraz zgon z którejkolwiek z powyższych przyczyn [176]. Mimo że śmiertelność z powodu CHD zmniejszyła się w ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat w krajach zachodnich, nadal jest ona przyczyną około jednej trzeciej wszystkich zgonów u osób powyżej 35. roku życia [177]. Mimo że obecnie stosowane leczenie CHD obniżyło liczbę nawrotów choroby i zgonów, osoby z CHD nadal są narażone na wysokie ryzyko wystąpienia tych powikłań. U jednej trzeciej wszystkich pacjentów z CHD ze znanymi, kontrolowanymi czynnikami ryzyka dochodzi do nawrotu choroby w ciągu kolejnych 10 lat [178]. To zjawisko nazywa się ryzykiem rezydualnym (szczętkowym) i podjęto wiele działań w celu jego wyeliminowania. Zapalenie i stres oksydacyjny to dwa z procesów zaangażowanych w rozwój miażdżycy i CHD. Uważa się, że stres oksydacyjny jest konsekwencją zwiększonego stężenia krążących neurohormonów i zaburzeń hemodynamicznych. Upośledzenie funkcji serca może być spowodowane zaburzeniem równowagi redoks, uszkodzeniem oksydacyjnym cząsteczek komórkowych lub uszkodzeniem sygnalizacji komórkowej upośledzającym przeżycie komórek i prowadzącym do ich śmierci [179,180].

Prawdopodobny związek między stężeniem CP w surowicy a występowaniem miażdżycy i innych schorzeń układu sercowo-naczyniowego został po raz pierwszy zasugerowany w latach 50. XX wieku [181]. Wysokie stężenie CP w surowicy stwierdzono u pacjentów z miażdżycą tętnic [182], niestabilną dławicą piersiową [183], udarem mózgu i MI [184]. Badania prospektywne wykazały, że CP w surowicy może być niezależnym czynnikiem ryzyka chorób sercowo-naczyniowych. Badanie kliniczno-kontrolne przeprowadzone przez Reunanena i wsp. (1992) było pierwszym, które wykazało, że CP w surowicy jest dodatnio związane z CHD [185]. Ponieważ stan zapalny jest uznawany za kluczowy czynnik w progresji miażdżycy, Mori i wsp. (1995) oddzielili ryzyko związane z CP od ryzyka związanego z zapaleniem [podwyższone poziomy takich białek jak:  $\alpha$ 1-antytrypsyna, kwaśna  $\alpha$ 1-glikoproteina,  $\alpha$ 2-makroglobulina, haptoglobina, fibrynogen, białko wiążące C4b, lipoproteina a i białko C-reaktywne (CRP, ang. *C-reactive protein*)] i zasugerowali, że CP może służyć jako niezależny czynnik ryzyka miażdżycy naczyń wieńcowych oraz jako marker ciężkości choroby [186]. W tym kontekście Klipstein-Grobusch i wsp. (1999) potwierdzili związek między stężeniem CP w surowicy a późniejszym MI w czteroletnim badaniu kontrolnym. Ryzyko MI dla najwyższego w porównaniu z najniższym kwartylem poziomu CP wynosiło 2,46 (95%, CI 1,04-6,00), a zależność ta utrzymywała się po uzupełnieniu innymi potencjalnymi czynnikami, takimi jak białko C-reaktywne lub liczba leukocytów (obniżając jedną trzecią efektu), co potwierdza teorię, że nadmiar CP sam w sobie przyczynia się istotnie do ryzyka CHD [187, 188, 189, 190].

W prospektywnym badaniu kliniczno-kontrolnym przeprowadzonym przez Kumar i wsp. (2009), którego celem była identyfikacja i ocena potencjalnych czynników ryzyka u pacjentów z normolipidemią i ostrym zawałem serca, ponownie stwierdzono,

że poziom CP był wyższy u chorych pacjentów niż w grupie kontrolnej; w badaniu oceniano również inne potencjalne markery, takie jak lipoproteina a, CRP i fibrynogen [191]. Subkliniczna martwica mięśnia sercowego jako cecha prognostyczna długoterminowego ryzyka wystąpienia niekorzystnych zdarzeń sercowych była wielokrotnie badana. Tang i wsp. (2010) zbadali ją po raz pierwszy w grupie 3828 pacjentów poddawanych planowej diagnostycznej koronarografii z poziomem troponiny I poniżej wartości odcięcia dla określenia i diagnozy zawału mięśnia sercowego. Autorzy badali mechanizmy leżące u podstaw martwicy mięśnia sercowego i ryzyka wystąpienia poważnych niekorzystnych zdarzeń sercowo-naczyniowych. Poziomy CRP i CP były związane z subkliniczną martwicą mięśnia sercowego po 3 latach obserwacji [192]. Następnie Tang i wsp. (2012) badali związek między stężeniem CP a częstością występowania poważnych niepożądanych zdarzeń sercowo-naczyniowych (MACE = zgon, zawał i udar) u 4177 pacjentów poddanych planowej angiografii wieńcowej po 3 latach obserwacji. Przeprowadzili oni badanie asocjacyjne obejmujące cały genom CP w celu określenia wariantów genetycznych, które mogłyby być związane z występowaniem incydentów sercowo-naczyniowych. Stężenie CP w surowicy wiązało się z wyższym ryzykiem zawału serca, gdy porównywano górny kwartyl z najniższym. Poziom CP pozostawał niezależnym czynnikiem predykcyjnym MACE. Warianty genetyczne w genie CP nie były związane z chorobowym lub incydentalnym ryzykiem choroby wieńcowej [193]. Do podobnych wniosków doszli Grammer i wsp. (2014), którzy zbadali, czy stężenia miedzi i CP w surowicy były związane z chorobą wieńcową oraz śmiertelnością ze wszystkich przyczyn i z przyczyn sercowo-naczyniowych. Stężenie CP było niezależnie związane ze zwiększonym ryzykiem zgonu [194]. Wreszcie u 4658 uczestników badania *Malmö Diet and Cancer Study* analizowano siedem markerów zapalnych w celu oceny ich częstości występowania w chorobach sercowo-naczyniowych i cukrzycy (zdarzenia wieńcowe, w tym śmiertelny i niezakończony zgonem zawał serca lub udar). CP, obok innych markerów, korelowała ze zwiększonym ryzykiem chorób sercowo-naczyniowych, ale nie cukrzycy [195].

## 6. Podsumowanie

Ceruloplazmina jest ferrokсыdazą surowicy, która zawiera więcej niż 95% miedzi występującej w osoczu. Białko to pochodzi z rodziny oksydaz wielomiedziowych, ewolucyjnie konserwatywnej grupy białek, które wykorzystują miedź do sprzęgania utleniania substratów z czteroelektronową redukcją tlenu do wody. Liczne badania wykazały istotną rolę CP w homeostazie żelaza poprzez jej aktywność ferrokсыdazową. Pomimo zapotrzebowania na miedź w funkcjonowaniu ceruloplazminy, białko to nie odgrywa istotnej roli w transporcie lub metabolizmie tego metalu. Ponadto wykazano, że CP posiada aktywność antyoksydacyjną, która może chronić tkanki przed uszkodzeniem oksydacyjnym.

Związek pomiędzy neurodegeneracją a brakiem CP został po raz pierwszy zidentyfikowany u pacjentów z aceruloplazminemią trzy dekady temu. Aceruloplazminemia jest chorobą neurodegeneracyjną wynikającą z dziedzicznych mutacji powodujących utratę funkcji w genie ceruloplazminy. Charakterystyka tego zaburzenia ujawniła ważną fizjologiczną rolę ceruloplazminy w określaniu tempa odpływu żelaza z komórek i dostarczyła nowych spostrzeżeń na temat metabolizmu żelaza u ludzi. Ponadto nieprawidłowy metabolizm jonów metali i stres oksydacyjny występują w innych chorobach

neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Wilsona, Alzheimer'a i Parkinsona. Akumulacja żelaza w mózgu i obniżona aktywność CP są związane z neurodegeneracją. Obecnie uważa się, że neurotoksyczność akumulacji żelaza i Cu wynikająca z niedoboru lub obniżonej aktywności CP jest jednym z mechanizmów rozwoju chorób neurodegeneracyjnych. Nie wiadomo jednak, czy kumulacja tych jonów jest przyczyną, czy skutkiem neurodegeneracji. Istnieje coraz więcej dowodów na to, że CP może odgrywać rolę neuroprotekcijną w chorobach neurodegeneracyjnych. Niektórzy badacze wykazali pozytywne wyniki leczenia poprzez regulację aktywności CP w chorobach neurodegeneracyjnych. Przyszłe badania powinny mieć na celu poznanie molekularnych mechanizmów neurodegeneracji oraz zbadanie innych funkcji CP. Pozwoli to na opracowanie skutecznych terapeutycznie leków, które mogłyby utrzymywać równowagę niezbędnych metali w mózgu.

W badaniach epidemiologicznych związek pomiędzy stężeniem CP a chorobami sercowo-naczyniowymi i innymi schorzeniami nie jest jeszcze jasny, choć powszechnie uznaje się, że rola odgrywana przez CP w przeciwdziałaniu stresowi oksydacyjnemu jest kluczowa. Większość badań potwierdza bezpośredni związek pomiędzy podwyższonym poziomem CP a ryzykiem chorób sercowo-naczyniowych. Pacjenci z wysokim stężeniem CP w surowicy byli bardziej narażeni na wystąpienie incydentów sercowych. Jednak CP nie może być obecnie uznawana za marker ryzyka choroby wieńcowej, który mógłby mieć jakąkolwiek wartość w ustalaniu priorytetów interwencji zapobiegawczych wśród osób z nierozpoznaną chorobą układu sercowo-naczyniowego lub oferować zalecenia dla osób we wtórnej profilaktyce tych chorób [180].

## Literatura

1. Patel B.N., David S., *A novel glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin is expressed by mammalian astrocytes*, Journal of Biological Chemistry, 272(32), 1997, s. 20185-20190.
2. Holmberg C.G., Laurell C.B., *Investigations in serum copper. II. Isolation of the copper-containing protein and a description of some of its properties*, Acta Chemica Scandinavica, 2, 1948, s. 550-556.
3. Healy J., Tipton K., *Ceruloplasmin and what it might do*, Journal of Neural Transmission (Vienna), 114(6), 2007, s. 777-781.
4. Linder M.C., *Ceruloplasmin and other copper binding components of blood plasma and their functions: an update*, Metallomics, 8(9), 2016, s. 887-905.
5. Fortna R.R., Watson H.A., Nyquist S.E., *Glycosyl phosphatidylinositol-anchored ceruloplasmin is expressed by rat Sertoli cells and is concentrated in detergent-insoluble membrane fractions*, Biology of Reproduction, 61(4), 1999, s. 1042-1049.
6. Hahn P., Qian Y., Dentchev T., Chen L., Beard J., Harris Z.L., Dunaief J.L., *Disruption of ceruloplasmin and hephaestin in mice causes retinal iron overload and retinal degeneration with features of age-related macular degeneration*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101(38), 2004, s. 13850-13855.
7. Hellman N.E., Gitlin J.D., *Ceruloplasmin metabolism and function*, Annual Review of Nutrition, 22, 2002, s. 439-458.
8. Texel S.J., Xu X., Harris Z.L., *Ceruloplasmin in neurodegenerative diseases*, Biochemical Society Transactions, 36, 2008, s. 1277-1281.
9. Shukla N., Maher J., Masters J., Angelini G.D., Jeremy J.Y., *Does oxidative stress change ceruloplasmin from a protective to a vasculopathic factor?* Atherosclerosis, 187(2), 2006, s. 238-250.

10. Vasilyev V.B., *Interactions of caeruloplasmin with other proteins participating in inflammation*, Biochemical Society Transactions, 38(4), 2010, s. 947-951.
11. Jiang R., Hua C., Wan Y., Jiang B., Hu H., Zheng J., Fuqua B.K., Dunaief J.L., Anderson G.J., David S., Vulpe C.D., Chen H., *Hephaestin and ceruloplasmin play distinct but interrelated roles in iron homeostasis in mouse brain*, Journal of Nutrition, 145(5), 2015, s. 1003-1009.
12. Rupaimoole R., Lee J., Haemmerle M., Ling H., Previs R.A., Pradeep S., Wu S.Y., Ivan C., Ferracin M., Dennison J.B., Millward N.M.Z., Nagaraja A.S., Gharpure K.M., McGuire M., Sam N., Armaiz-Pena G.N., Sadaoui N.C., Rodriguez-Aguayo C., Calin G.A., Drapkin R.I., Kovacs J., Mills G.B., Zhang W., Lopez-Berestein G., Bhattacharya P.K., Sood A.K., *Long noncoding RNA ceruloplasmin promotes cancer growth by altering glycolysis*, Cell Reports, 13(11), 2015, s. 2395-2402.
13. De Domenico I., Ward D.M., Bonaccorsi di Patti M.C., Jeong S.Y., David S., Musci G., Kaplan J., *Ferroxidase activity is required for the stability of cell surface ferroportin in cells expressing GPI-ceruloplasmin*, The EMBO Journal, 26(12), 2007, s. 2823-2831.
14. Olivieri S., Conti A., Iannaccone S., Cannistraci C.V., Campanella A., Barbariga M., Codazzi F., Pelizzoni I., Magnani G., Pesca M., Franciotta D., Cappa S.F., Alessio M., *Ceruloplasmin oxidation, a feature of Parkinson's disease CSF, inhibits ferroxidase activity and promotes cellular iron retention*, The Journal of Neuroscience, 31(50), 2011, s. 18568-18577.
15. Kono S., *Aceruloplasminemia: an update*, International Review of Neurobiology, 110, 2013, s. 125-151.
16. Siotto M., Simonelli I., Pasqualetti P., Mariani S., Caprara D., Bucossi S., Ventriglia M., Molinaro R., Antenucci M., Rongioletti M., Rossini P.M., Squitti R., *Association between serum ceruloplasmin specific activity and risk of Alzheimer's disease*, Journal of Alzheimer's Disease, 50(4), 2016, s. 1181-1189.
17. Linder M.C., *Ceruloplasmin and other copper binding components of blood plasma and their functions: an update*, Metallomics, 8(9), 2016, s. 887-905.
18. Daimon M., Yamatani K., Igarashi M., Fukase N., Kawanami T., Kato T., Tominaga M., Sasaki H., *Fine structure of the human ceruloplasmin gene*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 208(3), 1995, s. 1028-1035.
19. Korzh S., Emelyanov A., Korzh V., *Developmental analysis of ceruloplasmin gene and liver formation in zebrafish*, Mechanisms of Development, 103(1-2), 2001, s. 137-139.
20. Bielli P., Calabrese L., *Structure to function relationships in ceruloplasmin: a 'moonlighting' protein*, Cellular and Molecular Life Sciences, 59(9), 2002, s. 1413-1427.
21. Linder M.C., *Biochemistry of copper*, Plenum Press, New York, 1991.
22. Zaitseva I., Zaitsev V., Card G., Moshkov K., Bax B., Ralph A., Lindley P., *Nature of the copper centres in human ceruloplasmin*, JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry, 1, 1996, s. 15-23.
23. Zaitsev V.N., Zaitseva I., Papiz M., Lindley P., *An X-ray crystallographic study of the binding sites of the azide inhibitor and organic substrates to ceruloplasmin, a multicopper oxidase in the plasma*, JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry, 4, 1999, s. 579-587.
24. Gray L.W., Kidane T.Z., Nguyen A., Akagi S., Petrusek K., Chu Y.L., Cabrera A., Kantardjiev K., Mason A.Z., Linder M.C., *Copper proteins and ferroxidases in human plasma and that of wild-type and ceruloplasmin knockout mice*, Biochemical Journal, 419(1), 2009, s. 237-245.
25. Wooten L., Shulze R., Lancey R., Lietzow M., Linder M.C., *Ceruloplasmin is found in milk and amniotic fluid and may have a nutritional role*, Journal of Nutritional Biochemistry, 7, 1996, s. 632-639.
26. Linder M.C., Wooten L., Cerveza P., Cotton S., Shulze R., Lomeli N., *Copper transport*, The American Journal of Clinical Nutrition, 67(5), 1998, s. 965-971.

27. Donley S.A., Ilagan B.J., Rim H., Linder M.C., *Copper transport to mammary gland and milk during lactation in rats*, American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism, 283(4), 2002, s. 667-675.
28. Banha J., Marques L., Oliveira R., Martins Mde F., Paixão E., Pereira D., Malhó R., Penque D., Costa L., *Ceruloplasmin expression by human peripheral blood lymphocytes: a new link between immunity and iron metabolism*, Free Radical Biology and Medicine, 44(3), 2008, s. 483-492.
29. Marques L., Auriac A., Willemetz A., Banha J., Silva B., Canonne-Hergaux F., Costa L., *Immune cells and hepatocytes express glycoposphatidylinositol-anchored ceruloplasmin at their cell surface*, Blood Cells, Molecules and Diseases, 48, 2012, s. 110-120.
30. Patel B.N., Dunn R.J., David S., *Alternative RNA splicing generates a glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin in mammalian brain*, Journal of Biological Chemistry, 275(6), 2000, s. 4305-4310.
31. Salzer J.L., Lovejoy L., Linder M.C., Rosen C., *Ran-2, a glial lineage marker, is a GPI-anchored form of ceruloplasmin*, Journal of Neuroscience Research, 54(2), 1998, s. 147-157.
32. Mostad E.J., Prohaska J.R., *Glycosylphosphatidylinositol-linked ceruloplasmin is expressed in multiple rodent organs and is lower following dietary copper deficiency*, Experimental Biology and Medicine (Maywood), 236(3), 2011, s. 298-308.
33. Mittal B., Doroudchi M.M., Jeong S.Y., Patel B.N., David S., *Expression of a membrane-bound form of the ferroxidase ceruloplasmin by leptomeningeal cells*, Glia, 41(4), 2003, s. 337-346.
34. Yang F.M., Friedrichs W.E., Cupples R.L., Bonifacio M.J., Sanford J.A., Horton W.A., Bowman B.H., *Human ceruloplasmin. Tissue-specific expression of transcripts produced by alternative splicing*, Journal of Biological Chemistry, 265(18), 1990, s. 10780-10785.
35. Sato M., Gitlin J.D., *Mechanisms of copper incorporation during the biosynthesis of human ceruloplasmin*, Journal of Biological Chemistry, 266(8), 1991, s. 5128-5134.
36. Middleton R.B., Linder M.C., *Synthesis and turnover of ceruloplasmin in rats treated with 17 beta-estradiol*, Archives of Biochemistry and Biophysics, 302(2), 1993, s. 362-368.
37. Hirano K., Ogihara T., Ogihara H., Hiroi M., Hasegawa M., Tamai H., *Identification of apo- and holo-forms of ceruloplasmin in patients with Wilson's disease using native polyacrylamide gel electrophoresis*, Clinical Biochemistry, 38(1), 2005, s. 9-12.
38. Holtzman N.A., Gaumnitz B.M., *Studies on the rate of release and turnover of ceruloplasmin and apoceruloplasmin in rat plasma*, Journal of Biological Chemistry, 245(9), 1970, s. 2354-2358.
39. Sedlák E., Zoldák G., Wittung-Stafshede P., *Role of copper in thermal stability of human ceruloplasmin*, Biophysical Journal, 94(4), 2008, s. 1384-1391.
40. Olivares M., Uauy R., *Copper as an essential nutrient*, The American Journal of Clinical Nutrition, 63(5), 1996, s. 791-796.
41. Mackiewicz A., Ganapathi M.K., Schultz D., Samols D., Reese J., Kushner I., *Regulation of rabbit acute phase protein biosynthesis by monokines*, Biochemical Journal, 253(3), 1988, s. 851-857.
42. Ahmad S., Sultan S., Naz N., Ahmad G., Alwahsh S.M., Cameron S., Moriconi F., Ramadori G., Malik I.A., *Regulation of iron uptake in primary culture rat hepatocytes: the role of acute-phase cytokines*, Shock, 41(4), 2014, s. 337-345.
43. Ganaraja B., Pavithran P., Ghosh S., *Effect of estrogen on plasma ceruloplasmin level in rats exposed to acute stress*, Indian Journal of Medical Sciences, 58(4), 2004, s. 150-154.
44. Guller S., Buhimschi C.S., Ma Y.Y., Huang S.T., Yang L., Kuczynski E., Zambrano E., Lockwood C.J., Buhimschi I.A., *Placental expression of ceruloplasmin in pregnancies complicated by severe preeclampsia*, Laboratory Investigation, 88(10), 2008, s. 1057-1067.
45. Harris Z.L., Durley A.P., Man T.K., Gitlin J.D., *Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96(19), 1999, s. 10812-10817.

46. Vashchenko G., MacGillivray R.T., *Multi-copper oxidases and human iron metabolism*, *Nutrients*, 5(7), 2013, s. 2289-2313.
47. Ragan H.A., Nacht S., Lee G.R., Bishop C.R., Cartwright G.E., *Effect of ceruloplasmin on plasma iron in copper-deficient swine*, *American Journal of Physiology*, 217(5), 1969, s. 1320-1323.
48. Osaki S., Johnson D.A., *Mobilization of liver iron by ferroxidase (ceruloplasmin)*, *Journal of Biological Chemistry*, 244(20), 1969, s. 5757-5758.
49. Topham R.W., Frieden E., *Identification and purification of a non-ceruloplasmin ferroxidase of human serum*, *Journal of Biological Chemistry*, 245(24), 1970, s. 6698-6705.
50. Collins J.F., Prohaska J.R., Knutson M.D., *Metabolic crossroads of iron and copper*, *Nutrition Reviews*, 68(3), 2010, s. 133-147.
51. Sarkar J., Seshadri V., Tripoulas N.A., Ketterer M.E., Fox P.L., *Role of ceruloplasmin in macrophage iron efflux during hypoxia*, *Journal of Biological Chemistry*, 278(45), 2003, s. 44018-44024.
52. Jeong S.Y., David S., *Glycosylphosphatidylinositol-anchored ceruloplasmin is required for iron efflux from cells in the central nervous system*, *Journal of Biological Chemistry*, 278(29), 2003, s. 27144-27148.
53. Ward D.M., Kaplan J., *Ferroportin-mediated iron transport: expression and regulation*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1823(9), 2012, s. 1426-1433.
54. White K.N., Conesa C., Sánchez L., Amini M., Farnaud S., Lorzoralak C., Evans R.W., *The transfer of iron between ceruloplasmin and transferrins*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1820(3), 2012, s. 411-416.
55. Eid C., Hémadi M., Ha-Duong N.T., El Hage Chahine J.M., *Iron uptake and transfer from ceruloplasmin to transferrin*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840(6), 2014, s. 1771-1781.
56. Linder M.C., *Mobilization of stored iron in mammals: a review*, *Nutrients*, 5(10), 2013, s. 4022-4050.
57. Zerounian N.R., Linder M.C., *Effects of copper and ceruloplasmin on iron transport in the Caco 2 cell intestinal model*, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(3), 2013, s. 138-148.
58. Anderson G.J., Frazer D.M., McKie A.T., Vulpe C.D., *The ceruloplasmin homolog hephaestin and the control of intestinal iron absorption*, *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 29(3), 2002, s. 367-375.
59. Harris D.C., Aisen P., *Facilitation of Fe(II) autoxidation by Fe(III) complexing agents*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 329(1), 1973, s. 156-158.
60. Steinbicker A.U., Muckenthaler M.U., *Out of balance – systemic iron homeostasis in iron-related disorders*, *Nutrients*, 5(8), 2013, s. 3034-3061.
61. Poggiali E., Migone De Amicis M., Motta I., *Anemia of chronic disease: a unique defect of iron recycling for many different chronic diseases*, *European Journal of Internal Medicine*, 25(1), 2014, s. 12-17.
62. Ramos D., Mar D., Ishida M., Vargas R., Gaité M., Montgomery A., Linder M.C., *Mechanism of copper uptake from blood plasma ceruloplasmin by mammalian cells*, *PLoS One*, 11(3), 2016, s. 149516.
63. Prohaska J.R., *Impact of copper limitation on expression and function of multicopper oxidases (ferroxidases)*, *Advances in Nutrition*, 2(2), 2011, s. 89-95.
64. Wong B.X., Ayton S., Lam L.Q., Lei P., Adlard P.A., Bush A.I., Duce J.A., *A comparison of ceruloplasmin to biological polyanions in promoting the oxidation of Fe<sup>2+</sup> under physiologically relevant conditions*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840(12), 2014, s. 3299-3310.
65. Mukhopadhyay C.K., Attieh Z.K., Fox P.L., *Role of ceruloplasmin in cellular iron uptake*, *Science*, 279(5351), 1998, s. 714-717.
66. Attieh Z.K., Mukhopadhyay C.K., Seshadri V., Tripoulas N.A., Fox P.L., *Ceruloplasmin ferroxidase activity stimulates cellular iron uptake by a trivalent cation-specific transport mechanism*, *Journal of Biological Chemistry*, 274(2), 1999, s. 1116-1123.

67. Richards D.A., *Use of high-performance liquid chromatography to study the caeruloplasmin-catalysed oxidation of biogenic amines. I. Single substrate systems*, Journal of Chromatography A, 256(1), 1983, s. 71-79.
68. Biegański T., Blasinska M.Z., Kusche J., *Determination of histaminase (diamine oxidase) activity by o-dianisidine test: interference of ceruloplasmin*, Agents Actions, 7(1), 1977, s. 85-92.
69. Shiva S., Wang X., Ringwood L.A., Xu X., Yuditskaya S., Annavajjhala V., Miyajima H., Hogg N., Harris Z.L., Gladwin M.T., *Ceruloplasmin is a NO oxidase and nitrite synthase that determines endocrine NO homeostasis*, Nature Chemical Biology, 2(9), 2006, s. 486-493.
70. Vrancken K., Schroeder H.J., Longo L.D., Power G.G., Blood A.B., *Role of ceruloplasmin in nitric oxide metabolism in plasma of humans and sheep: a comparison of adults and fetuses*, The American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 305(11), 2013, s. 1401-1410.
71. Zhao X.J., Wang L., Shiva S., Tejero J., Myerburg M.M., Wang J., Frizzell S., Gladwin M.T., *Mechanisms for cellular NO oxidation and nitrite formation in lung epithelial cells*, Free Radical Biology and Medicine, 61, 2013, s. 428-437.
72. Lazzaro M., Bettegazzi B., Barbariga M., Codazzi F., Zacchetti D., Alessio M., *Ceruloplasmin potentiates nitric oxide synthase activity and cytokine secretion in activated microglia*, Journal of Neuroinflammation, 11, 2014, s. 164.
73. Goldstein I.M., Kaplan H.B., Edelson H.S., Weissmann G., *Ceruloplasmin. A scavenger of superoxide anion radicals*, Journal of Biological Chemistry, 254(10), 1979, s. 4040-4045.
74. Goldstein I.M., Charo I.F., *Ceruloplasmin: an acute phase reactant and anti-oxidant*, Lymphokines, 8, 1981, s. 373-411.
75. Gutteridge J.M., Winyard P.G., Blake D.R., Lunec J., Brailsford S., Halliwell B., *The behaviour of caeruloplasmin in stored human extracellular fluids in relation to ferroxidase II activity, lipid peroxidation and phenanthroline-detectable copper*, Biochemical Journal, 230(2), 1985, s. 517-523.
76. Kono S., Yoshida K., Tomosugi N., Terada T., Hamaya Y., Kanaoka S., Miyajima H., *Biological effects of mutant ceruloplasmin on hepcidin-mediated internalization of ferroportin*, Biochimica et Biophysica Acta, 1802(11), 2010, s. 968-975.
77. Miyajima H., Kono S., Takahashi Y., Sugimoto M., *Increased lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction in aceruloplasminemia brains*, Blood Cells, Molecules and Diseases, 29(3), 2002, s. 433-438.
78. Grolez G., Moreau C., Sablonnière B., Garçon G., Devedjian J.C., Meguig S., Gelé P., Delmaire C., Bordet R., Defebvre L., Cabantchik I.Z., Devos D., *Ceruloplasmin activity and iron chelation treatment of patients with Parkinson's disease*, BMC Neurology, 15, 2015, s. 74.
79. Tórsdóttir G., Kristinsson J., Sveinbjörnsdóttir S., Snaedal J., Jóhannesson T., *Copper, ceruloplasmin, superoxide dismutase and iron parameters in Parkinson's disease*, Pharmacology and Toxicology, 85(5), 1999, s. 239-243.
80. Percival S.S., Harris E.D., *Copper transport from ceruloplasmin: characterization of the cellular uptake mechanism*, American Journal of Physiology, 258(1), 1990, s. 140-146.
81. Lee S.H., Lancey R., Montaser A., Madani N., Linder M.C., *Ceruloplasmin and copper transport during the latter part of gestation in the rat*, Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 203(4), 1993, s. 428-439.
82. Hilton M., Spenser D.C., Ross P., Ramsey A., McArdle H.J., *Characterisation of the copper uptake mechanism and isolation of the ceruloplasmin receptor/copper transporter in human placental vesicles*, Biochimica et Biophysica Acta, 1245(2), 1995, s. 153-160.
83. Campbell C.H., Brown R., Linder M.C., *Circulating ceruloplasmin is an important source of copper for normal and malignant animal cells*, Biochimica et Biophysica Acta, 678(1), 1981, s. 27-38.



84. Gambling L., Danzeisen R., Fosset C., Andersen H.S., Dunford S., Srai S.K., McArdle H.J., *Iron and copper interactions in development and the effect on pregnancy outcome*, Journal of Nutrition, 133(5), 2003, s. 1554-1556.
85. Moriya M., Ho Y.H., Grana A., Nguyen L., Alvarez A., Jamil R., Ackland M.L., Michalczyk A., Hamer P., Ramos D., Kim S., Mercer J.F., Linder M.C., *Copper is taken up efficiently from albumin and alpha2-macroglobulin by cultured human cells by more than one mechanism*, The American Journal of Physiology – Cell Physiology, 295(3), 2008, s. 708-721.
86. Meyer L.A., Durley A.P., Prohaska J.R., Harris Z.L., *Copper transport and metabolism are normal in aceruloplasminemic mice*, Journal of Biological Chemistry, 276(39), 2001, s. 36857-36861.
87. Ganz T., Nemeth E., *Iron homeostasis in host defence and inflammation*, Nature Reviews Immunology, 15(8), 2015, s. 500-510.
88. Naz N., Malik I.A., Sheikh N., Ahmad S., Khan S., Blaschke M., Schultze F., Ramadori G., *Ferroportin-1 is a 'nuclear'-negative acute-phase protein in rat liver: a comparison with other iron-transport proteins*, Laboratory Investigation, 92(6), 2012, s. 842-856.
89. Conley L., Geurs T.L., Levin L.A., *Transcriptional regulation of ceruloplasmin by an IL-6 response element pathway*, Molecular Brain Research, 139, 2005, s. 235-241.
90. Sidhu A., Miller P.J., Hollenbach A.D., *FOXO1 stimulates ceruloplasmin promoter activity in human hepatoma cells treated with IL-6*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 404(4), 2011, s. 963-967.
91. Zakharova E.T., Kostevich V.A., Sokolov A.V., Vasilyev V.B., *Human apo-lactoferrin as a physiological mimetic of hypoxia stabilizes hypoxia-inducible factor-1 alpha*, Biometals, 25(6), 2012, s. 1247-1259.
92. Chepelev N.L., Willmore W.G., *Regulation of iron pathways in response to hypoxia*, Free Radical Biology and Medicine, 50(6), 2011, s. 645-666.
93. Hart B.A., Voss G.W., Garvey J.S., *Induction of pulmonary metallothionein following oxygen exposure*, Environmental Research, 50(2), 1989, s. 269-278.
94. Fleming R.E., Gitlin J.D., *Primary structure of rat ceruloplasmin and analysis of tissue-specific gene expression during development*, Journal of Biological Chemistry, 265(13), 1990, s. 7701-7707.
95. Schilsky M.L., Stockert R.J., Pollard J.W., *Ceruloplasmin biosynthesis by the human uterus*, Biochemical Journal, 288(2), 1992, s. 657-661.
96. Thomas T., Macpherson A., Rogers P., *Ceruloplasmin gene expression in the rat uterus*, Biochimica et Biophysica Acta, 1261(1), 1995, s. 77-82.
97. Puchkova L.V., Zhiguleva C.A., Mokshina S.V., Bichevaia N.K., Platonova N.A., Skvortsova N.N., Sasina L.K., Tsybalenko N.V., Chebotar' N.A., Gaitshoki V.S., *Rol' zheltokhogo meshka v metabolizme medi v c'mbriogeneze krysa [The role of the yolk sac in copper metabolism during rat embryogenesis]*, Ontogenez, 32(3), 2001, s. 204-211.
98. Andersen H.S., Gambling L., Holtrop G., McArdle H.J., *Effect of dietary copper deficiency on iron metabolism in the pregnant rat*, British Journal of Nutrition, 97(2), 2007, s. 239-246.
99. Tong K.K., McArdle H.J., *Copper uptake by cultured trophoblast cells isolated from human term placenta*, Biochimica et Biophysica Acta, 1269(3), 1995, s. 233-236.
100. Linder M.C., *Nutritional biochemistry of copper, with emphasis on the perinatal period*, [w:] Avigliano L. (red.), *Biochemical Aspects of Human Nutrition. Research Signpost*, Trivandrum, Kerala, India, 2010, s. 143-179.
101. Chu Y.L., Sauble E.N., Cabrera A., Roth A., Ackland M.L., Mercer J.F., Linder M.C., *Lack of ceruloplasmin expression alters aspects of copper transport to the fetus and newborn, as determined in mice*, Biometals, 25(2), 2012, s. 373-382.
102. Bandmann O., Weiss K.H., Kaler S.G., *Wilson's disease and other neurological copper disorders*, The Lancet Neurology, 14(1), 2015, s. 103-113.
103. Poujois A., Woimant F., *Wilson's disease: A 2017 update*, Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology, 42(6), 2018, s. 512-520.

104. Cocos R., Œendroi A., Schipor S., Bohilea L.C., Œendroi I., Raicu F., *Genotype-phenotype correlations in a mountain population community with high prevalence of Wilson's disease: genetic and clinical homogeneity*, PLoS One, 9(6), 2014, s. 98520.
105. Wu F., Wang J., Pu C., Qiao L., Jiang C., *Wilson's disease: a comprehensive review of the molecular mechanisms*, International Journal of Molecular Sciences, 16(3), 2015, s. 6419-6431.
106. Hahn S.H., Lee S.Y., Jang Y.J., Kim S.N., Shin H.C., Park S.Y., Han H.S., Yu E.S., Yoo H.W., Lee J.S., Chung C.S., Lee S.Y., Lee D.H., *Pilot study of mass screening for Wilson's disease in Korea*, Molecular Genetics and Metabolism, 76(2), 2002, s. 133-136.
107. Coffey A.J., Durkie M., Hague S., McLay K., Emmerson J., Lo C., Klaffke S., Joyce C.J., Dhawan A., Hadzic N., Mieli-Vergani G., Kirk R., Allen K., Nicholl D., Wong S., Griffiths W., Smithson S., Giffin N., Taha A., Connolly S., Gillett G.T., Tanner S., Bonham J., Sharrack B., Palotie A., Rattray M., Dalton A., Bandmann O., *A genetic study of Wilson's disease in the United Kingdom*, Brain, 136(5), 2013, s. 1476-1487.
108. Gouider-Khouja N., *Wilson's disease*, Parkinsonism & Related Disorders, 15(3), 2009, s. 126-129.
109. Davies K.M., Hare D.J., Cottam V., Chen N., Hilgers L., Halliday G., Mercer J.F., Double K.L., *Localization of copper and copper transporters in the human brain*, Metallomics, 5(1), 2013, s. 43-51.
110. Barnes N., Tsvivkovskii R., Tsvivkovskaia N., Lutsenko S., *The copper-transporting ATPases, menkes and wilson disease proteins, have distinct roles in adult and developing cerebellum*, Journal of Biological Chemistry, 280(10), 2005, s. 9640-9645.
111. Roberts E.A., Robinson B.H., Yang S., *Mitochondrial structure and function in the untreated Jackson toxic milk (tx-j) mouse, a model for Wilson disease*, Molecular Genetics and Metabolism, 93(1), 2008, s. 54-65.
112. Scheiber I.F., Bruha R., Dusek P., *Pathogenesis of Wilson disease*, Handbook of Clinical Neurology, 142, 2017, s. 43-55.
113. Hayashi H., Yano M., Fujita Y., Wakusawa S., *Compound overload of copper and iron in patients with Wilson's disease*, Medical Molecular Morphology, 39(3), 2006, s. 121-126.
114. Erikson K.M., Syversen T., Steinnes E., Aschner M., *Globus pallidus: a target brain region for divalent metal accumulation associated with dietary iron deficiency*, Journal of Nutritional Biochemistry, 15(6), 2004, s. 335-341.
115. Sinha S., Taly A.B., Ravishankar S., Prashanth L.K., Venugopal K.S., Arunodaya G.R., Vasudev M.K., Swamy H.S., *Wilson's disease: cranial MRI observations and clinical correlation*, Neuroradiology, 48(9), 2006, s. 613-621.
116. Bruehlmeier M., Leenders K.L., Vontobel P., Calonder C., Antonini A., Weindl A., *Increased cerebral iron uptake in Wilson's disease: a 52Fe-citrate PET study*, The Journal of Nuclear Medicine, 41(5), 2000, s. 781-787.
117. Roeser H.P., Lee G.R., Nacht S., Cartwright G.E., *The role of ceruloplasmin in iron metabolism*, Journal of Clinical Investigation, 49(12), 1970, s. 2408-2417.
118. Jursa T., Smith D.R., *Ceruloplasmin alters the tissue disposition and neurotoxicity of manganese, but not its loading onto transferrin*, Toxicological Sciences, 107(1), 2009, s. 182-193.
119. Peng F., Lutsenko S., Sun X., Muzik O., *Imaging copper metabolism imbalance in Atp7b (-/-) knockout mouse model of Wilson's disease with PET-CT and orally administered 64CuCl2*, Molecular Imaging and Biology, 14(5), 2012, s. 600-607.
120. Pal A., Vasishta Rk., Prasad R., *Hepatic and hippocampus iron status is not altered in response to increased serum ceruloplasmin and serum "free" copper in Wistar rat model for non-Wilsonian brain copper toxicosis*, Biological Trace Element Research, 154(3), 2013, s. 403-411.
121. Wang B., Wang X.P., *Does ceruloplasmin defend against neurodegenerative diseases?* Current Neuropharmacology, 17(6), 2019, s. 539-549.

122. Salomão R.P., Pedrosa J.L., Gama M.T., Dutra L.A., Maciel R.H., Godeiro-Junior C., Chien H.F., Teive H.A., Cardoso F., Barsottini O.G., *A diagnostic approach for neurodegeneration with brain iron accumulation: clinical features, genetics and brain imaging*, Arquivos de Neuro-Psiquiatria, 74(7), 2016, s. 587-596.
123. Krueger M.C., Boddaert N., *Neurodegeneration with brain iron accumulation: a diagnostic algorithm*, Seminars in Pediatric Neurology, 19(2), 2012, s. 67-74.
124. Arber C.E., Li A., Houlden H., Wray S., *Review: Insights into molecular mechanisms of disease in neurodegeneration with brain iron accumulation: unifying theories*, Neuropathology and Applied Neurobiology, 42(3), 2016, s. 220-241.
125. Dusek P., Schneider S.A., *Neurodegeneration with brain iron accumulation*, Current Opinion in Neurology, 25(4), 2012, s. 499-506.
126. Miyajima H., *Aceruloplasminemia, an iron metabolic disorder*, Neuropathology, 23(4), 2003, s. 345-350.
127. Patel B.N., Dunn R.J., Jeong S.Y., Zhu Q., Julien J.P., David S., *Ceruloplasmin regulates iron levels in the CNS and prevents free radical injury*, The Journal of Neuroscience, 22(15), 2002, s. 6578-6586.
128. Bonaccorsi di Patti M.C., Maio N., Rizzo G., De Francesco G., Persichini T., Colasanti M., Polticelli F., Musci G., *Dominant mutants of ceruloplasmin impair the copper loading machinery in aceruloplasminemia*, Journal of Biological Chemistry, 284(7), 2009, s. 4545-4554.
129. Schulz K., Vulpe C.D., Harris L.Z., David S., *Iron efflux from oligodendrocytes is differentially regulated in gray and white matter*, The Journal of Neuroscience, 31(37), 2011, s. 13301-13311.
130. Levi S., Finazzi D., *Neurodegeneration with brain iron accumulation: update on pathogenic mechanisms*, Frontiers in Pharmacology, 5, 2014, s. 99.
131. Vassiliev V., Harris Z.L., Zatta P., *Ceruloplasmin in neurodegenerative diseases*, Brain Research Reviews, 49(3), 2005, s. 633-640.
132. Brissot P., Ropert M., Le Lan C., Loréal O., *Non-transferrin bound iron: a key role in iron overload and iron toxicity*, Biochimica et Biophysica Acta, 1820(3), 2012, s. 403-410.
133. Kono S., Miyajima H., *Molecular and pathological basis of aceruloplasminemia*, Biological Research, 39(1), 2006, s. 15-23.
134. Stoj C.S., Augustine A.J., Solomon E.I., Kosman D.J., *Structure-function analysis of the cuprous oxidase activity in Fet3p from Saccharomyces cerevisiae*, Journal of Biological Chemistry, 282(11), 2007, s. 7862-7868.
135. Mathys Z.K., White A.R., *Copper and Alzheimer's Disease*, Advances in Neurobiology, 18, 2017, s. 199-216.
136. Ballatore C., Lee V.M., Trojanowski J.Q., *Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders*, Nature Reviews Neuroscience, 8(9), 2007, s. 663-672.
137. LaFerla F.M., Green K.N., Oddo S., *Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease*, Nature Reviews Neuroscience, 8(7), 2007, s. 499-509.
138. Nakamura M., Shishido N., Nunomura A., Smith M.A., Perry G., Hayashi Y., Nakayama K., Hayashi T., *Three histidine residues of amyloid-beta peptide control the redox activity of copper and iron*, Biochemistry, 46(44), 2007, s. 12737-12743.
139. James S.A., Churches Q.I., de Jonge M.D., Birchall I.E., Streltsov V., McColl G., Adlard P.A., Hare D.J., *Iron, Copper, and Zinc Concentration in Aβ Plaques in the APP/PS1 Mouse Model of Alzheimer's Disease Correlates with Metal Levels in the Surrounding Neuropil*, ACS Chemical Neuroscience, 8(3), 2017, s. 629-637.
140. Wang P., Wang Z.Y., *Metal ions influx is a double edged sword for the pathogenesis of Alzheimer's disease*, Ageing Research Reviews, 35, 2017, s. 265-290.
141. Jellinger K.A., *The relevance of metals in the pathophysiology of neurodegeneration, pathological considerations*, International Review of Neurobiology, 110, 2013, s. 1-47.
142. Squitti R., Barbati G., Rossi L., Ventriglia M., Dal Forno G., Cesaretti S., Moffa F., Caridi I., Cassetta E., Pasqualetti P., Calabrese L., Lupoi D., Rossini P.M., *Excess of*

- nonceruloplasmin serum copper in AD correlates with MMSE, CSF [beta]-amyloid, and h-tau*, *Neurology*, 67(1), s. 76-82.
143. Brewer G.J., *The risks of copper toxicity contributing to cognitive decline in the aging population and to Alzheimer's disease*, *Journal of the American College of Nutrition*, 28(3), 2006, s. 238-242.
  144. Noda Y., Asada M., Kubota M., Maesako M., Watanabe K., Uemura M., Kihara T., Shimohama S., Takahashi R., Kinoshita A., Uemura K., *Copper enhances APP dimerization and promotes A $\beta$  production*, *Neuroscience Letters*, 547, 2013, s. 10-15.
  145. Ventriglia M., Bucossi S., Panetta V., Squitti R., *Copper in Alzheimer's disease: a meta-analysis of serum, plasma, and cerebrospinal fluid studies*, *Journal of Alzheimer's Disease*, 30(4), 2012, s. 981-984.
  146. Squitti R., Simonelli I., Ventriglia M., Siotto M., Pasqualetti P., Rembach A., Doecke J., Bush A.I., *Meta-analysis of serum non-ceruloplasmin copper in Alzheimer's disease*, *Journal of Alzheimer's Disease*, 38(4), 2014, s. 809-822.
  147. Smith M.A., Zhu X., Tabaton M., Liu G., McKeel D.W. Jr, Cohen M.L., Wang X., Siedlak S.L., Dwyer B.E., Hayashi T., Nakamura M., Nunomura A., Perry G., *Increased iron and free radical generation in preclinical Alzheimer disease and mild cognitive impairment*, *Journal of Alzheimer's Disease*, 19(1), 2010, s. 363-372.
  148. Bousejra-ElGarah F., Bijani C., Coppel Y., Faller P., Hureau C., *Iron(II) binding to amyloid- $\beta$ , the Alzheimer's peptide*, *Inorganic Chemistry*, 50(18), 2011, s. 9024-9030.
  149. Becerril-Ortega J., Bordji K., Fréret T., Rush T., Buisson A., *Iron overload accelerates neuronal amyloid- $\beta$  production and cognitive impairment in transgenic mice model of Alzheimer's disease*, *Neurobiology of Aging*, 35(10), 2014, s. 2288-2301.
  150. Bush A.I., *The Metal Theory of Alzheimer's Disease*, *Journal of Alzheimer's Disease*, 30, 2012, s. 1-5.
  151. Avan A., Hoogenraad T.U., *Zinc and copper in Alzheimer's disease*, *Journal of Alzheimer's Disease*, 46(1), 2015, s. 89-92.
  152. Kawahara M., Tanaka K.I., Kato-Negishi M., *Zinc, carnosine, and neurodegenerative diseases*, *Nutrients*, 10(2), 2018, s. 147.
  153. Atrián-Blasco E., Conte-Daban A., Hureau C., *Mutual interference of Cu and Zn ions in Alzheimer's disease: perspectives at the molecular level*, *Dalton Trans*, 46(38), 2017, s. 12750-12759.
  154. Bucossi S., Mariani S., Ventriglia M., Polimanti R., Gennarelli M., Bonvicini C., Pasqualetti P., Scrascia F., Migliore S., Vernieri F., Rossini P.M., Squitti R., *Association between the c. 2495 A>G ATP7B polymorphism and sporadic Alzheimer's disease*, *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2011, s. 973692.
  155. Squitti R., Polimanti R., Bucossi S., Ventriglia M., Mariani S., Manfellotto D., Vernieri F., Cassetta E., Ursini F., Rossini P.M., *Linkage disequilibrium and haplotype analysis of the ATP7B gene in Alzheimer's disease*, *Rejuvenation Research*, 16(1), 2013, s. 3-10.
  156. Bhimani R., *Understanding the burden on caregivers of people with Parkinson's. A Scoping review of the literature*, *Rehabilitation Research and Practice*, 2014, s. 718527.
  157. Jankovic J., *Parkinson's disease: clinical features and diagnosis*, *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 79(4), 2008, s. 368-376.
  158. Maass A., Reichmann H., *Sleep and non-motor symptoms in Parkinson's disease*, *Journal of Neural Transmission (Vienna)*, 120(4), 2013, s. 565-569.
  159. Braak H., Del Tredici K., Rüb U., de Vos R.A., Jansen Steur E.N., Braak E., *Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease*, *Neurobiology of Aging*, 24(2), 2003, s. 197-211.
  160. Gaki G.S., Papavassiliou A.G., *Oxidative stress-induced signaling pathways implicated in the pathogenesis of Parkinson's disease*, *Neuromolecular Medicine*, 16(2), 2014, s. 217-230.
  161. Stojkowska I., Wagner B.M., Morrison B.E., *Parkinson's disease and enhanced inflammatory response*, *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*, 240(11), 2015, s. 1387-1395.

162. Ouchi Y., Yoshikawa E., Sekine Y., Futatsubashi M., Kanno T., Ogunu T., Torizuka T., *Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease*, *Annals of Neurology*, 57(2), 2005, s. 168-175.
163. Niranjan R., *The role of inflammatory and oxidative stress mechanisms in the pathogenesis of Parkinson's disease: focus on astrocytes*, *Molecular Neurobiology*, 49(1), 2014, s. 28-38.
164. Wei Z., Li X., Li X., Liu Q., Cheng Y., *Oxidative stress in Parkinson's disease. A Systematic review and meta-analysis*, *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, 2018, s. 236.
165. Jenner P., *Oxidative stress in Parkinson's disease*, *Annals of Neurology*, 53(3), 2003, s. 36-38.
166. Schapira A.H., *Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease*, *Cell Death & Differentiation*, 14(7), 2007, s. 1261-1266.
167. Gaier E.D., Eipper B.A., Mains R.E., *Copper signaling in the mammalian nervous system: synaptic effects*, *Journal of Neuroscience Research*, 91(1), 2013, s. 2-19.
168. Montes S., Rivera-Mancia S., Diaz-Ruiz A., Tristan-Lopez L., Rios C., *Copper and copper proteins in Parkinson's disease*, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, s. 147251.
169. McNeill A., Pandolfo M., Kuhn J., Shang H., Miyajima H., *The neurological presentation of ceruloplasmin gene mutations*, *European Neurology*, 60(4), 2008, s. 200-205.
170. Dusek P., Roos P.M., Litwin T., Schneider S.A., Flaten T.P., Aaseth J., *The neurotoxicity of iron, copper and manganese in Parkinson's and Wilson's diseases*, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 31, 2015, s. 193-203.
171. Ayton S., Lei P., Duce J.A., Wong B.X., Sedjahtera A., Adlard P.A., Bush A.I., Finkelstein D.I., *Ceruloplasmin dysfunction and therapeutic potential for Parkinson disease*, *Annals of Neurology*, 73(4), 2013, s. 554-559.
172. Johannesson T., Kristinsson J., Torsdottir G., Snaedal J., *Serúlóplasmin og járn. Tengsl við Alzheimersjúkdóm og Parkinsonsjúkdóm [Ceruloplasmin (Cp) and iron in connection with Parkinson's disease (PD) and Alzheimer's disease (AD)]*, *Læknabladid*, 98(10), 2012, s. 531-537, Icelandic.
173. Devos D., Moreau C., Devedjian J.C., Kluza J., Petrault M., Laloux C., Jonneaux A., Ryckewaert G., Garçon G., Rouaix N., Duhamel A., Jissendi P., Dujardin K., Auger F., Ravasi L., Hopes L., Grolez G., Firdaus W., Sablonnière B., Strubi-Vuillaume I., Zahr N., Destée A., Corvol J.C., Pöhl D., Leist M., Rose C., Defebvre L., Marchetti P., Cabantchik Z.I., Bordet R., *Targeting chelatable iron as a therapeutic modality in Parkinson's disease*, *Antioxidants & Redox Signaling*, 21(2), 2014, s. 195-210.
174. Barbariga M., Curnis F., Andolfo A., Zanardi A., Lazzaro M., Conti A., Magnani G., Volontè M.A., Ferrari L., Comi G., Corti A., Alessio M., *Ceruloplasmin functional changes in Parkinson's disease-cerebrospinal fluid*, *Molecular Neurodegeneration*, 10, 2015, s. 59.
175. Conti A., Iannaccone S., Sferrazza B., De Monte L., Cappa S., Franciotta D., Olivieri S., Alessio M., *Differential expression of ceruloplasmin isoforms in the cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients*, *Proteomics – Clinical Applications*, 2(12), 2008, s. 1628-1637.
176. Benjamin E.J., Muntner P., Alonso A., Bittencourt M.S., Callaway C.W., Carson A.P., Chamberlain A.M., Chang A.R., Cheng S., Das S.R., Delling F.N., Djousse L., Elkind M.S.V., Ferguson J.F., Fornage M., Jordan L.C., Khan S.S., Kissela B.M., Knutson K.L., Kwan T.W., Lackland D.T., Lewis T.T., Lichtman J.H., Longenecker C.T., Loop M.S., Lutsey P.L., Martin S.S., Matsushita K., Moran A.E., Mussolino M.E., O'Flaherty M., Pandey A., Perak A.M., Rosamond W.D., Roth G.A., Sampson U.K.A., Satou G.M., Schroeder E.B., Shah S.H., Spartano N.L., Stokes A., Tirschwell D.L., Tsao C.W., Turakhia M.P., VanWagner L.B., Wilkins J.T., Wong S.S., Virani S.S.; American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee, *Heart disease and stroke statistics-2019 update. A report from the American Heart Association*, *Circulation*, 139(10), 2019, s. 56-528.
177. Nichols M., Townsend N., Scarborough P., Rayner M., *Cardiovascular disease in Europe 2014: epidemiological update*, *European Heart Journal*, 35(42), 2014, s. 2929.

178. Sampson U.K., Fazio S., Linton M.F., *Residual cardiovascular risk despite optimal LDL cholesterol reduction with statins: the evidence, etiology, and therapeutic challenges*, Current Atherosclerosis Reports, 14(1), 2012, s. 1-10.
179. Radovanovic S., Savic-Radojevic A., Pljesa-Ercegovac M., Djukic T., Suvakov S., Krotin M., Simic D.V., Matic M., Radojicic Z., Pekmezovic T., Simic T., *Markers of oxidative damage and antioxidant enzyme activities as predictors of morbidity and mortality in patients with chronic heart failure*, Journal of Cardiac Failure, 18(6), 2012, s. 493-501.
180. Arenas de Larriva A.P., Limia-Pérez L., Alcalá-Díaz J.F., Alonso A., López-Miranda J., Delgado-Lista J., *Ceruloplasmin and coronary heart disease – a systematic review*, Nutrients, 12(10), 2020, s. 3219.
181. Adelstein S.J., Coombs T.L., Vallee B.L., *Metalloenzymes and myocardial infarction. I. The relation between serum copper and ceruloplasmin and its catalytic activity*, The New England Journal of Medicine, 255(3), 1956, s. 105-109.
182. Bustamante J.B., Mateo M.C., Fernandez J., de Quiros B., Manchado O.O., *Zinc, copper and ceruloplasmin in arteriosclerosis*, Biomedicine, 25(7), 1976, s. 244-245.
183. Jayakumari N., Ambikakumari V., Balakrishnan K.G., Iyer K.S., *Antioxidant status in relation to free radical production during stable and unstable anginal syndromes*, Atherosclerosis, 94(2-3), 1992, s. 183-190.
184. Enbergs A., Dorszewski A., Luft M., Mönnig G., Kleemann A., Schulte H., Assmann G., Breithardt G., Kerber S., *Failure to confirm ferritin and caeruloplasmin as risk factors for the angiographic extent of coronary arteriosclerosis*, Coronary Artery Disease, 9(2-3), 1998, s. 119-124.
185. Reunanen A., Knekt P., Aaran R.K., *Serum ceruloplasmin level and the risk of myocardial infarction and stroke*, American Journal of Epidemiology, 136(9), 1992, s. 1082-1090.
186. Mori T., Sasaki J., Kawaguchi H., Handa K., Takada Y., Matsunaga A., Kono S., Arakawa K., *Serum glycoproteins and severity of coronary atherosclerosis*, American Heart Journal, 129(2), 1995, s. 234-238.
187. Klipstein-Grobusch K., Grobbee D.E., Koster J.F., Lindemans J., Boeing H., Hofman A., Witteman J.C., *Serum caeruloplasmin as a coronary risk factor in the elderly: the Rotterdam study*, British Journal of Nutrition, 81(2), 1999, s. 139-144.
188. Brunetti N.D., Pellegrino P.L., Correale M., De Gennaro L., Cuculo A., Di Biase M., *Acute phase proteins and systolic dysfunction in subjects with acute myocardial infarction*, Journal of Thrombosis and Thrombolysis, 26(3), 2008, s. 196-202.
189. Göçmen A.Y., Sahin E., Semiz E., Gümuşlü S., *Is elevated serum ceruloplasmin level associated with increased risk of coronary artery disease?* Canadian Journal of Cardiology, 24(3), 2008, s. 209-212.
190. Kaur K., Bedi G., Kaur M., Vij A., Kaur I., *Lipid peroxidation and the levels of antioxidant enzymes in coronary artery disease*, Indian Journal of Clinical Biochemistry, 23(1), 2008, s. 33-37.
191. Kumar A., Nagtilak S., Sivakanesan R., Gunasekera S., *Cardiovascular risk factors in elderly normolipidemic acute myocardial infarct patients – a case controlled study from India*, The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, 40(3), 2009, s. 581-592.
192. Tang W.H., Wu Y., Nicholls S.J., Brennan D.M., Pepoy M., Mann S., Pratt A., Van Lente F., Hazen S.L., *Subclinical myocardial necrosis and cardiovascular risk in stable patients undergoing elective cardiac evaluation*, Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology, 30(3), 2010, s. 634-640.
193. Tang W.H., Wu Y., Hartiala J., Fan Y., Stewart A.F., Roberts R., McPherson R., Fox P.L., Allayee H., Hazen S.L., *Clinical and genetic association of serum ceruloplasmin with cardiovascular risk*, Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology, 32(2), 2012, s. 516-522.
194. Grammer T.B., Kleber M.E., Silbernagel G., Pilz S., Schrnagl H., Lerchbaum E., Tomaschitz A., Koenig W., März W., *Copper, ceruloplasmin and long-term cardiovascular*

and total mortality (the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study), *Free Radical Research*, 48(6), 2014, s. 706-715.

195. Bao X., Borné Y., Johnson L., Muhammad I.F., Persson M., Niu K., Engström G., *Comparing the inflammatory profiles for incidence of diabetes mellitus and cardiovascular diseases: a prospective study exploring the 'common soil' hypothesis*, *Cardiovascular Diabetology*, 17(1), 2018, s. 87.

## Metabolizm i funkcja ceruloplazminy

### Streszczenie

Artykuł stanowi wprowadzenie do problematyki dotyczącej fizjologicznych funkcji i metabolicznych przemian ceruloplazminy (CP) – białka wielofunkcyjnego w organizmie człowieka i zwierząt, jednej z najważniejszych glikoprotein osocza krwi, wiążącej miedź i pełniącej rolę ferrokasydazy. Celem niniejszej pracy jest przedstawienie wyników badań w dostępnej literaturze wyjaśniających zagadnienia struktury i ekspresji CP, jej poziomu i aktywności, modyfikacyjnych przemian powiązanych z aktywnością ferrokasydacyjną i metabolizmem żelaza, utlenianiem hormonów, metabolizowaniem tlenu azotu (NO), a także funkcji związanych z odpowiedzią zapalną. Innym mechanizmem działania CP związanym z komórkami mikrogleju w mózgu jest wpływ na aktywność syntazy NO (iNOS), indukowanej czynnikami zapalnymi. Głównymi czynnikami determinującymi poziom CP w osoczu krwi są cytokiny zapalne, estrogeny i progestageny oraz niedobór miedzi. Wzrost produkcji CP w ostrej fazie występuje w połączeniu ze zmniejszonym odpływem żelaza z komórek, głównie w wątrobie, śledzionie i błonie śluzowej jelit. Praca omawia również szeroko prowadzone dyskusje nad CP jako jednym z głównych zewnątrzkomórkowych „zmiataaczy” wolnych rodników. Wykazano, że CP hamuje szereg reakcji utleniania, w których biorą udział nadtlenki organiczne i nadtlenek wodoru. Biorąc pod uwagę fakt, że zdolność CP do utleniania żelaza ułatwia uwalnianie tego metalu z komórek i umożliwia wiązanie żelaza z transferyną w płynie pozakomórkowym oraz we krwi, CP jest najbardziej znana ze swojej zdolności do utleniania  $Fe^{2+}$  do  $Fe^{3+}$  (ferro-oksydacja). Przeprowadzony przegląd literatury dowodzi, że CP występuje jako krążące źródło miedzi dla komórek. Artykuł omawia również rolę CP w chorobach neurodegeneracyjnych, tj. chorobie Wilsona, neurodegeneracyjnym uszkodzeniu z akumulacją żelaza w mózgu, chorobie Alzheimera, Parkinsona, jak również rolę CP w przebiegu chorób układu sercowo-naczyniowego.

Słowa kluczowe: ceruloplazmina, metabolizm żelaza, choroba Alzheimera, choroba Wilsona, choroba Parkinsona

## Metabolism and the function of ceruloplasmine

### Abstract

The article is an introduction to the issues of physiological functions and metabolic changes of ceruloplasmin (CP) – a multifunctional protein in the human and animal body, one of the most important blood plasma glycoproteins, binding copper and acting as ferroxidase. The aim of this study is to present the results of studies of the available literature explaining the issues of structure and expression, level and activity, modifying transformations related to ferroxidative activity and iron metabolism, hormone oxidation, nitric oxide (NO) metabolizing functions, and functions related to the inflammatory response. Another mechanism of CP action for microglial cells in the brain is the influence on the activity of inducible NO synthase (iNOS), induced by inflammatory factors. The main factors determining the level of CP in the blood plasma are inflammatory cytokines, estrogens and progestagens, and copper deficiency. The increase in CP production occurs in conjunction with decreased iron drainage from cells, mainly in the liver, spleen, and intestinal mucosa. The work also discusses the role of CP as one of the major extracellular "scavengers" of free radicals. CP has been shown to inhibit a number of oxidation reactions involving organic peroxides and hydrogen peroxide. Considering the fact that CP's ability to oxidize iron facilitates the release of this metal from cells and allows iron to bind to transferrin in the extracellular fluid and blood, CP is best known for its ability to oxidize  $Fe^{2+}$  to  $Fe^{3+}$  (ferro-oxidation). The literature review shows that CP acts as a circulating source of copper for cells. The article also discusses the role of CP in neurodegenerative diseases, such as Wilson's disease, neurodegenerative disorders with iron accumulation in the brain, Alzheimer's and Parkinson's diseases, as well as the role of CP in the course of cardiovascular diseases.

Keywords: ceruloplasmin, iron metabolism, Alzheimer's disease, Wilson's disease, Parkinson's disease

# **Analiza mechanizmu retencji kofeiny, kwercetyny oraz fenolu w wybranych układach chromatografii oddziaływań hydrofilowych (HILIC)**

## **1. Wstęp**

Chromatografia oddziaływań hydrofilowych (ang. *Hydrophilic Interaction Chromatography*, HILIC) od ponad 30 lat cieszy się niestąbnym zainteresowaniem jako metoda analizy polarnych oraz zjonizowanych analitów przy pomocy polarnych faz stacjonarnych [1]. Stanowi ona alternatywę dla innych metod chromatograficznych takich jak chromatografia w normalnym (ang. *Normal Phase Liquid Chromatography*, NPLC) oraz odwróconym (ang. *Reversed Phase Liquid Chromatography*, RPLC) układzie faz [1, 2]. Dodatkowymi atutami tej metody są: możliwość zastosowania szerokiego wachlarza metod detekcji, np. spektrometrii mas (ang. *mass spectrometry*, MS), wysoka selektywność oraz sprawność rozdzielania związków [3-5]. Fazę ruchomą w trybie HILIC stanowi mieszanina zawierająca najczęściej od 2% do 40% wody oraz acetonitryl lub inne rozpuszczalniki organiczne, np. alkohole. W celu kontrolowania pH oraz siły jonowej eluentu szeroko stosowane są dodatki substancji buforujących (octan amonu, mrówczan amonu) [2, 6].

Typowe fazy stacjonarne stosowane w HILIC bazują zwykle na żelu krzemionkowym oraz jego modyfikacjach polegających na chemicznym związaniu różnych grup funkcyjnych [7, 8]. Takie modyfikowane chemicznie fazy stacjonarne można podzielić w zależności od ładunku na fazy obojętne, fazy z ładunkiem oraz fazy dwubiegunowe (zwitterjonowe) [8-10]. Do faz obojętnych zalicza się adsorbenty modyfikowane grupami amidowymi, nitylowymi oraz diolowymi. Fazy obdarzone ładunkiem zawierają grupy aminowe, poliaminowe, imidiazolowe oraz triazolowe. Fazy dwubiegunowe stanowią nową klasę polarnych faz stacjonarnych. Tego typu adsorbenty zawierają zarówno silnie kwaśne grupy kwasu sulfonowego, jak i silnie zasadowe czwartorzędowe grupy amoniowe, oddzielone krótkimi łańcuchami alkilowymi [7, 9, 11].

Mechanizm retencji w chromatografii oddziaływań hydrofilowych stanowi przedmiot intensywnych badań wielu zespołów badawczych. Jeden z pierwszych proponowanych mechanizmów retencji w HILIC zakłada, że wodna część fazy ruchomej adsorbuje się na powierzchni polarnej fazy stacjonarnej (polarnych ligandów) w postaci cienkiej warstwy, w obrębie której następuje podział analitu pomiędzy tę warstwę i organiczną część fazy ruchomej [2]. Wielu autorów wskazuje także, że istotny wpływ na przebieg tego procesu, szczególnie przy użyciu eluentów o niskiej zawartości wody, mogą mieć również różnego typu oddziaływania adsorpcyjne oraz oddziaływania hydrofobowe i elektrostatyczne [2, 12, 13]. Ponadto – w przypadku związków zjonizowa-

---

<sup>1</sup> d412@stud.prz.edu.pl, Katedra Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Wydział Chemiczny, Politechnika Rzeszowska im. Ignacego Łukasiewicza.

<sup>2</sup> Katedra Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Wydział Chemiczny, Politechnika Rzeszowska im. Ignacego Łukasiewicza.



nych – czynnikiem wpływającym na mechanizm retencji może być także wymiana jonowa [14]. Względny udział poszczególnych mechanizmów i oddziaływań związanych z konkretnym przypadkiem procesu HILIC zależy od trzech ważnych czynników: warunków chromatograficznych, rodzaju i właściwości fazy stacjonarnej oraz efektów związanych ze strukturą i własnościami analitu. W rezultacie uzyskiwany obraz mechanizmu retencji w HILIC wydaje się być bardzo złożony [10].

### **1.1. Wpływ temperatury na proces retencji – wykres i równanie van't Hoffa**

Zmiany temperatury mają istotny wpływ na selektywność i efektywność chromatograficznego rozdzielania mieszanin, ponieważ wpływają na lepkość fazy ruchomej, współczynniki dyfuzji chromatografowanych związków, dysocjacji oraz na ich oddziaływanie z fazą stacjonarną. Badania wpływu temperatury na proces retencji umożliwiają ponadto ocenę mechanizmu retencji w rozpatrywanych układach [10, 14]. Wpływ temperatury na proces retencji analizowany jest zwykle w oparciu o wykres van't Hoffa (zależność  $\ln k = f(1/T)$ ). Wykres ten wykonuje się na podstawie wartości współczynników retencji  $k$  chromatografowanego związku, wyznaczanych dla możliwie szerokiego zakresu zmian temperatury kolumny. W sposób teoretyczny, temperatura fazy ruchomej ( $T$ ) oraz współczynnik retencji chromatografowanego analitu ( $k$ ) powiązane są ze sobą równaniem van't Hoffa [15, 16]:

$$\ln k = -\frac{\Delta H}{R \cdot T} + \frac{\Delta S}{R} + \ln F \quad (1)$$

gdzie:  $\Delta H$ , J/mol oraz  $\Delta S$ , J/molK – odpowiednio zmiany entalpii i entropii związane z przejściem chromatografowanego związku od fazy ruchomej do fazy stacjonarnej,  $R = 8,314$  J/mol·K – stała gazowa,  $F = \frac{1-\varepsilon_t}{\varepsilon_t}$  – stosunek faz,  $\varepsilon_t$  – porowatość całkowita złoża.

Liniowy przebieg zależności  $\ln k = f(1/T)$  wskazuje zwykle na dominujący wpływ pojedynczego mechanizmu na proces retencji. Natomiast przebiegi nieliniowe oznaczają zwykle zmianę mechanizmu retencji lub pojawienie się w globalnym mechanizmie retencji dodatkowych oddziaływań (np. wiązań wodorowych, oddziaływań hydrofobowych i/lub elektrostatycznych) wpływających na przebieg tego procesu [16-28]. Praktycznie we wszystkich rodzajach chromatografii cieczowej, w zależności od układu chromatograficznego, obserwuje się zarówno liniowe, jak i nieliniowe przebiegi wykresu van't Hoffa. W głównej mierze świadczy to o złożoności mechanizmu retencji w chromatografii cieczowej, na który wpływają zarówno własności fizykochemiczne składników układu chromatograficznego (analitu, fazy stacjonarnej i ruchomej), jak i wzajemne oddziaływania między nimi.

### **1.2. Sprawność kolumny chromatograficznej**

Sprawność kolumny chromatograficznej determinuje kształt piku chromatograficznego, a tym samym istotnie wpływa na jakość separacji analizowanych związków chemicznych. Sprawność kolumny określa się wysokością równoważną półce teoretycznej WRPT (ang. *Height Equivalent to Theoretical Plate*, HETP). Półkę teoretyczną definiuje się natomiast jako wysokość warstwy wypełnienia (adsorbentu) w kolumnie, na której ustala się równowaga adsorpcyjna pomiędzy fazą ruchomą a stacjonarną, zgodnie z wartością współczynnika podziału  $K$ . Na poszerzenie pasma chromatograficznego mają wpływ zasadniczo trzy czynniki [19, 20]:

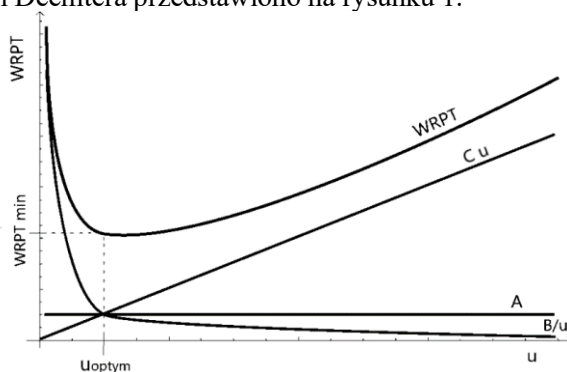
- dyfuzja wirowa, zależna od wypełnienia kolumny;
- dyfuzja wzdłużna (dyfuzja cząsteczkowa) w fazie ruchomej;
- opory przenoszenia masy.

W 1956 roku van Deemter zaproponował zależność łączącą ze sobą WRPT, kinetykę procesu rozdzielania chromatograficznego oraz liniową prędkość przepływu eluentu [19, 21]:

$$WRPT = A + \frac{B}{u} + C \cdot u \quad (2)$$

gdzie: A – określa dyfuzję wirową, B – dyfuzję molekularną w fazie ruchomej, C – opory przenoszenia masy, u – prędkość liniową fazy ruchomej.

Minimum powyższej funkcji dla prędkości  $u = u_{\text{optym}}$  odpowiada maksymalnej sprawności kolumny/układu chromatograficznego. Schematyczną, graficzną interpretację zależności van Deemtera przedstawiono na rysunku 1.



Rysunek 1. Graficzna interpretacja składowych równania van Deemtera oraz ich sumy (WRPT) w funkcji prędkości liniowej eluentu

## 2. Część eksperymentalna

### 2.1. Aparatura i odczynniki

Badania wykonano z wykorzystaniem wysokosprawnego chromatografu cieczowego Primaide firmy Merck–Hitachi (Niemcy). Aparat składał się z następujących urządzeń:

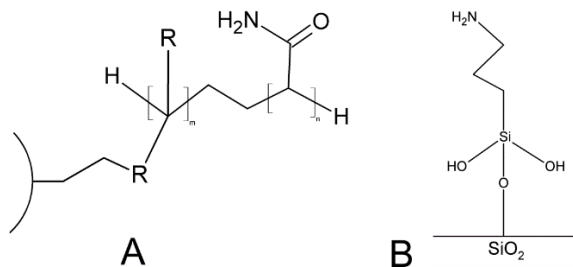
- pompa eluentu, model 1110;
- termostat kolumnowy, model 1310;
- detektor UV, model 1410.

Pracą chromatografu sterował program D-7000 HSM firmy Merck, przy pomocy którego rejestrowano oraz zapisywano na twardym dysku komputera wyniki eksperymentów.

W badaniach zastosowano następujące rozpuszczalniki oraz testowe związki chemiczne:

- acetonitryl, wyprodukowany przez firmę Merck, czystość  $\geq 99,9\%$ ;
- metanol, wyprodukowany przez firmę Merck, czystość  $\geq 99,9\%$ ;
- woda destylowana uzyskana przy pomocy ELKAR typ SolPure-78Z;
- kofeina, wyprodukowana przez Fluka Analytical, czystość  $\geq 99,0\%$ ;
- kwercetyna, wyprodukowana przez CHEMAL, czystość  $\geq 99,0\%$ ;
- fenol, wyprodukowany przez SIGMA – ALDRICH, czystość  $> 99,5\%$ .

Zastosowano następujące kolumny chromatograficzne: amidową TSKgel Amide-80 firmy Tosoh Bioscience (100 mm × 4,6 mm, średnica ziarna 5 μm) oraz aminową LiChroCART Purospher STAR NH<sub>2</sub> firmy Merck (150 mm × 4,6 mm, średnica ziarna 5 μm). Schematy struktur badanych faz stacjonarnych pokazano na rysunku 2.



Rysunek 2. Schematy struktur badanych faz stacjonarnych. A: TSKgel Amide-80, B: LiChroCART Purospher STAR NH<sub>2</sub>

## 2.2. Metodyka badań eksperymentalnych

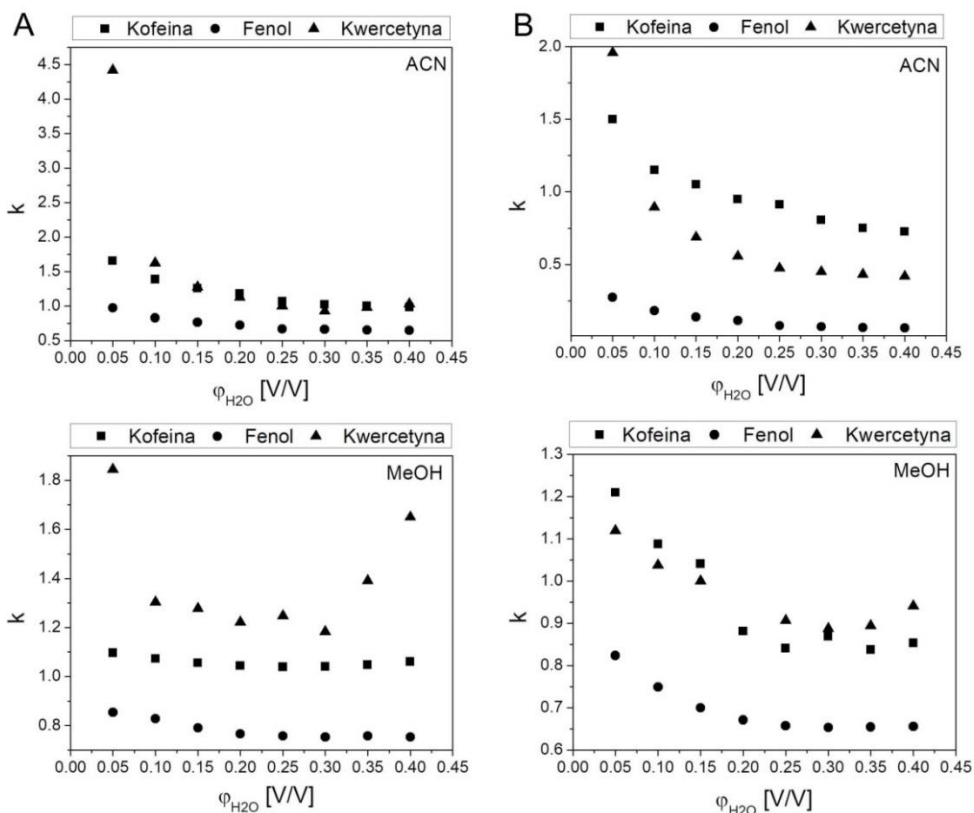
Pomiary wpływu składu fazy ruchomej oraz temperatury na retencję badanych analitów wykonywano w warunkach izokratycznych. Fazę ruchomą stanowiły mieszaniny wodno-acetonitrylowe oraz wodno-metanolowe. Natężenia przepływu eluentu wynosiły: dla kolumny LiChroCART Purospher STAR NH<sub>2</sub> 1 [cm<sup>3</sup>/min] zarówno w układach z acetonitrylem, jak i metanolem, natomiast dla kolumny TSKgel Amide-80 wynosiły one 1 [cm<sup>3</sup>/min] dla układów z acetonitrylem oraz 0,5 [cm<sup>3</sup>/min] dla układów z metanolem (ze względu na maksymalne dopuszczalne ciśnienie pracy kolumny). Stężenia badanych związków chemicznych wynosiły 20 [μg/cm<sup>3</sup>]. Roztwory analitów były sporządzane w odpowiednich eluentach (acetonitryl – woda oraz metanol – woda w zakresie od 60% do 95% v/v modyfikatora organicznego). Wpływ temperatury na proces retencji określono w zakresie od 20°C do 50°C, zmieniając temperaturę co 5°C. Objętość dozowanej próbki wynosiła 20 [μL]. Detekcję pików prowadzono przy długości fali 250 [nm].

Wartości entalpii ΔH i entropii ΔS w równaniu van't Hoffa wyznaczono metodą regresji liniowej na podstawie doświadczalnie otrzymanych zależności  $\ln k = f(1/T)$ . Dokładność dopasowania określano na podstawie współczynnika determinacji R<sup>2</sup>.

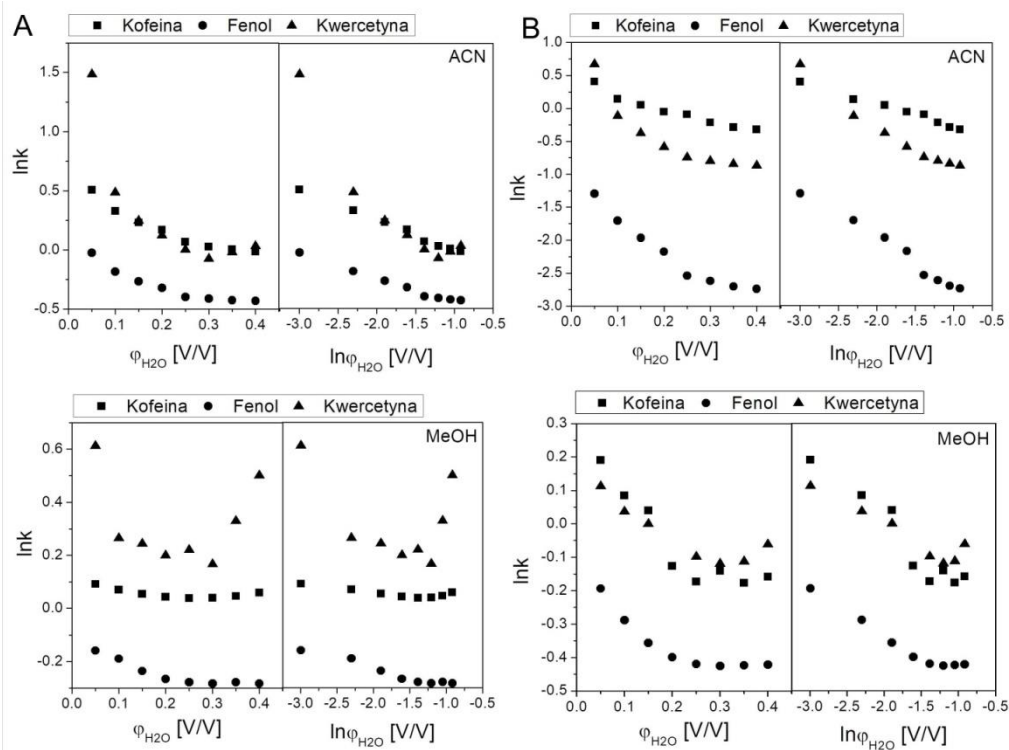
Sprawność kolumny analizowano na podstawie wykresów van Deemtera dla trzech wymienionych powyżej związków, stosując wodno-acetonitrylowe oraz wodno-metanolowe fazy ruchome dla dwóch stężeń rozpuszczalnika organicznego (70% i 90% V/V). Badania prowadzono w temperaturze 20°C dla natężeń przepływu eluentu wynoszących 0,05, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30, 0,40, 0,50, 0,65, 0,80, 1,0, 1,25, 1,50, 1,75, 2,00 oraz 3,0 [cm<sup>3</sup>/min]. Objętość dozowania oraz stężenia próbek były takie same, jak przedstawione powyżej. Wysokość równoważną półce teoretycznej (WRPT) wyznaczano na podstawie pierwszego i drugiego momentu centralnego otrzymanego pik chromatografowanego związku. W obliczeniach uwzględniono efekty dyspersyjne powodujące dodatkowe poszerzenie pik, związane z przepływem płynu przez kapilary umieszczone przed i za kolumną chromatograficzną (analogicznie jak powyżej, ale bez kolumny chromatograficznej).

### 2.3. Wpływ składu fazy ruchomej na retencję

Na rysunku 3 przedstawiono doświadczalnie wyznaczone zależności  $k=f(\varphi_{H_2O})$  dla kolumny aminowej LiChroCART Purospher STAR  $NH_2$  (rysunek 3 A), a także TSKgel Amide-80 (rysunek 3 B). Natomiast zależności  $\ln[\frac{k}{k_0}]=f(\varphi_{H_2O})$  i  $\ln[\frac{k}{k_0}]=f(\ln\varphi_{H_2O})$  przedstawiono na rysunku 4. Zgodnie z teorią Soczewińskiego – Snydera [22], liniowa zależność  $\ln k = f(\varphi)$  wskazuje na dominujący podziałowy mechanizm retencji, natomiast liniowa zależność  $\ln k = f(\ln\varphi)$  sugeruje adsorpcyjny mechanizm retencji. Przedstawione na rysunkach 3-4 zależności dla testowanych analitów, niezależnie od zastosowanej fazy stacjonarnej oraz składu eluentu wykazują silną nieliniowość. W przypadku kwercetyny dla kolumny aminowej zależności te przyjmują U – kształtną charakterystykę (rysunek 4 A). Świadczy to o przechodzeniu wraz ze zmianą zawartości modyfikatora organicznego jednego mechanizmu retencji w drugi. Uzyskane wyniki badań wskazują, że w eluentach bogatszych w wodę dominuje mechanizm podziałowy, natomiast w układach bogatszych w fazę organiczną dominuje mechanizm adsorpcyjny, w którym istotną rolę mogą odgrywać różnorodne oddziaływania w obrębie zaadsorbowanej warstewki wody. Globalny mechanizm retencji stanowi zatem kombinację mechanizmów adsorpcyjnego oraz podziałowego. Wniosek ten jest zgodny z teorią Hemströma i Irguma [23], według której mechanizm retencji (szczególnie w HILIC) jest kombinacją obydwóch ww. mechanizmów, ale w różnych proporcjach, zależnych od natury fazy stacjonarnej, właściwości analitu oraz składu eluentu.



Rysunek 3. Zależność współczynnika retencji od ułamka objętościowego wody w składzie fazy ruchomej: A – LiChroCART Purospher STAR  $NH_2$ , B – TSKgel Amide-80



Rysunek 4. Zależności  $\ln k = f(\phi_{H_2O})$  i  $\ln k = f(\ln \phi_{H_2O})$  dla kolumn: A – LiChroCART Purospher STAR NH<sub>2</sub>, B – TSKgel Amide-80

W celu dodatkowej, teoretycznej weryfikacji otrzymanych wyników badań doświadczalnych przeprowadzono porównanie dokładności modeli retencji w układzie  $k = f(\ln \phi_{H_2O})$  oraz  $k = f(\ln \phi_{buff})$ . Wyrażeniem najczęściej stosowanym do opisu podziałowego mechanizmu retencji jest model zaproponowany przez Soczewińskiego oraz Syndera [22-24]:

$$\ln k = p_1 - p_2 \phi \quad (3)$$

gdzie:  $\phi$  – ułamek molowy lub objętościowy modyfikatora,  $p_1$  oraz  $p_2$  parametry modelu.

W układach, w których lokalna adsorpcja determinuje opis globalnego mechanizmu retencji (NPLC), stosuje się model adsorpcyjny opisany równaniem [24]:

$$\ln k = p_1 - p_2 \ln \phi \quad (4)$$

Kolejny model retencji zależności  $k = f(\phi_{H_2O})$  w HILIC został zaproponowany przez Janderę i współpracowników [25]. Model ten znajduje zastosowanie dla szerokiego zakresu zmian zawartości wody/buforu w składzie fazy ruchomej:

$$\ln k = p_1 + p_2 \cdot \phi - p_3 \cdot \ln(1 + p_4 \cdot \phi) \quad (5)$$

gdzie:  $k$  – współczynnik retencji,  $\phi$  – ułamek objętościowy wody w eluencie,  $p_1$ - $p_4$  – parametry modelu.

Parametr  $p_1$  zależy od analitu i układu chromatograficznego, parametry  $p_2$  i  $p_3$  odnoszą się do efektów podziałowych i adsorpcyjnych związanych z wpływem stężenia wody na retencję analitu, parametr  $p_4$  jest współczynnikiem poprawkowym retencji dla fazy ruchomej zawierającej bardzo małe ilości wody.

Na rysunku 5 przedstawiono graficzne porównanie danych doświadczalnych z wynikami modelowania dla badanych kolumn w układach woda – modyfikator organiczny. W tabeli 1 zestawiono otrzymane wartości parametrów poszczególnych modeli oraz parametry trzech kryteriów statystycznych (odchylenie standardowe – SD, suma kwadratów różnic pomiędzy danymi doświadczalnymi i teoretycznymi – SUM oraz test Fishera – F) charakteryzujące dokładność poszczególnych modeli w opisie doświadczalnych zależności  $k = f(\ln\phi_{H_2O})$ :

- suma kwadratów różnic pomiędzy danymi doświadczalnymi i teoretycznymi (SUM):

$$SUM = \sum_{i=1}^N (k_{dosw}(i) - k_{teor}(i))^2 \quad (6)$$

- odchylenie standardowe (SD):

$$SD = \sqrt{\frac{SUM}{N-1}} \quad (7)$$

- test Fishera (F):

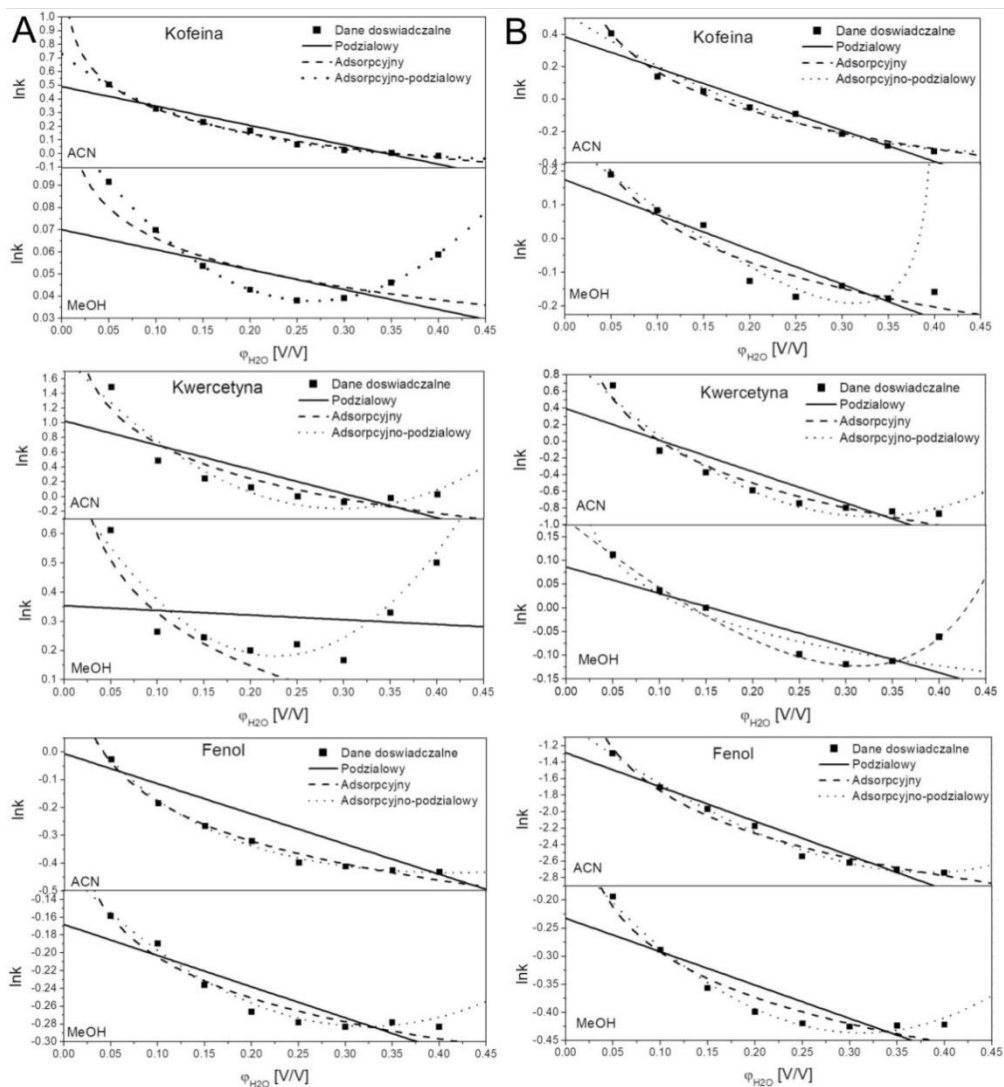
$$F = \frac{(N-1) \cdot \sum_{i=1}^N (k_{dosw}(i) - \frac{\sum_{i=1}^N k_{teor}(i)}{N})^2}{(N-1) \cdot \sum_{i=1}^N (k_{dosw}(i) - k_{teor}(i))^2} \quad (8)$$

gdzie:  $i = 1 \dots N$ ,  $N$  – liczba punktów doświadczalnych,  $1$  – liczba estymowanych parametrów modelu.

Na podstawie przedstawionych rysunków oraz wartości kryteriów statystycznych można ogólnie stwierdzić, iż najdokładniejszy opis wpływu stężenia modyfikatora eluentu na wartości współczynnika retencji uzyskuje się za pomocą modelu podziałowego (4) oraz modelu adsorpcyjno-podziałowego (5) niezależnie od zastosowanego modyfikatora eluentu. Świadczą o tym najniższe wartości SD oraz SUM, a także największe wartości testu Fishera. Tym samym uzasadnione zostają wcześniejsze założenia odnośnie do zaproponowanych mechanizmów retencji substancji testowych w badanych układach.

## 2.4. Wpływ temperatury na retencję

Zależności współczynnika retencji od temperatury  $\ln[\phi]k = f(1/T)$  analizowanych związków dla kolumn amidowej oraz aminowej w wybranych składach faz ruchomych zaprezentowano na rysunku 6. Wartości entalpii  $\Delta H$  i entropii adsorpcji  $\Delta S$  (obliczone z równania van't Hoffa) oraz współczynniki korelacji  $R^2$  zestawiono w tabeli 2. Uzyskane liniowe zależności van't Hoffa, oraz wartości entalpii  $\Delta H < 0$ , dla kofeiny niezależnie od zastosowanego układu, wskazują, iż procesy sorpcji mają charakter egzotermiczny. W przypadku fenolu oraz kwercetyny egzotermiczny charakter procesu ( $\Delta H < 0$ ) uzyskano dla układów z metanolem niezależnie od zastosowanej fazy stacjonarnej. Jednakże w momencie zastosowania tych substancji dla układów zawierających acetonitryl – otrzymane dodatnie wartości entalpii świadczą o endotermicznym charakterze procesu sorpcji zarówno dla kolumny amidowej, jak i aminowej.



Rysunek 5. Przykładowe porównanie danych doświadczalnych i wyników modelowania dla układów woda – modyfikator organiczny (A – LiChroCART Purospher STAR NH<sub>2</sub>, B – TSKgel Amide-80)

Tabela 1. Wartości estymowanych parametrów modeli retencji wraz z przedziałami ufności ich wyznaczenia dla kofeiny w testowanych układach chromatograficznych

Parametr		LiChroCART Purospher STAR NH <sub>2</sub>					
		Kofeina		Kwercetyna		Fenol	
		ACN–H <sub>2</sub> O	MeOH–H <sub>2</sub> O	ACN–H <sub>2</sub> O	MeOH–H <sub>2</sub> O	ACN–H <sub>2</sub> O	MeOH–H <sub>2</sub> O
Podziałowy	p <sub>1</sub>	0,49 ± 0,46	0,07 ± 0,01	1,02 ± 0,01	0,35 ± 0,13	0,006 ± 0,003	-0,16 ± 0,01
	p <sub>2</sub>	1,428 ± 0,18	0,09 ± 0,04	3,28 ± 0,01	0,15 ± 0,05	1,085 ± 0,01	0,34 ± 0,01
	SD	<b>0,021</b>	<b>0,01</b>	<b>0,35</b>	<b>0,16</b>	<b>0,05</b>	<b>0,02</b>
	SUM	<b>0,021</b>	<b>0,001</b>	<b>0,74</b>	<b>0,17</b>	<b>0,02</b>	<b>3,31 · 10<sup>-3</sup></b>
	Test F	<b>9,51</b>	<b>1,428</b>	<b>2,16</b>	<b>0,87</b>	<b>5,90</b>	<b>4,16</b>

Adsorpcyj- ny	p <sub>1</sub>	-0,27 ±0,53	0,02 ±0,01	-0,84 ±0,21	0,17 ±0,01	-0,64 ±0,01	-0,35 ±0,01
	p <sub>2</sub>	0,25 ±0,08	0,02 ±0,003	0,67 ±0,11	0,08 ±0,01	0,20 ±0,01	0,06 ±0,006
	SD	<b>0,016</b>	<b>0,01</b>	<b>0,21</b>	<b>0,14</b>	<b>0,01</b>	<b>0,012</b>
	SUM	<b>0,001</b>	<b>7,0·10<sup>-4</sup></b>	<b>0,28</b>	<b>0,15</b>	<b>2,21·10<sup>-3</sup></b>	<b>9,55·10<sup>-4</sup></b>
	Test F	<b>134,1</b>	<b>2,52</b>	<b>5,64</b>	<b>1,007</b>	<b>54,24</b>	<b>14,5</b>
Adsorpcyjno- podziały	p <sub>1</sub>	0,73 ±0,08	0,12 ±0,0004	1,90 ±0,48	0,78 ±0,01	0,20 ±0,08	-0,10 ±0,01
	p <sub>2</sub>	-1,54 ±0,10	16,59 ±4,50	721,60 ±89,53	246,2 ±0,01	-1,55 ±0,1	82,89 ±6,18
	p <sub>3</sub>	1,028 ±0,13	117,3 ±6,40	1,0·10 <sup>-4</sup> ±383	2552 ±0,01	0,81 ±0,73	1991 ±34,88
	p <sub>4</sub>	-6,96 ±0,96	0,13 ±0,03	0,06 ±0,04	0,09 ±0,01	9,18 ±1,03	0,04 ±0,02
	SD	<b>0,02</b>	<b>9,04·10<sup>-5</sup></b>	<b>0,19</b>	<b>0,07</b>	<b>0,01</b>	<b>7,9·10<sup>-3</sup></b>
	SUM	<b>0,001</b>	<b>3,267·10<sup>-8</sup></b>	<b>0,15</b>	<b>0,02</b>	<b>6,83·10<sup>-4</sup></b>	<b>2,49·10<sup>-3</sup></b>
	Test F	<b>124,9</b>	<b>4,11·10<sup>4</sup></b>	<b>6,83</b>	<b>4,89</b>	<b>120,2</b>	<b>37,00</b>

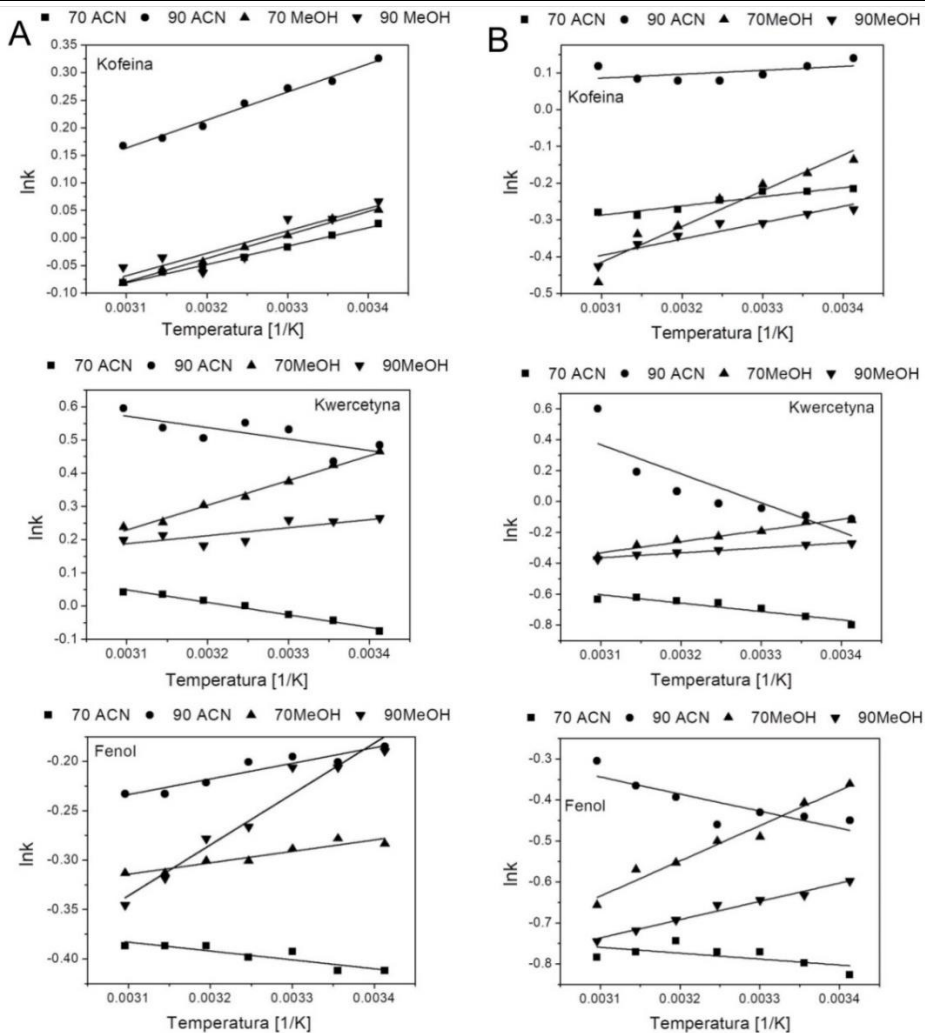
Tabela 1. cd. Wartości estymowanych parametrów modeli retencji wraz z przedziałami ufności ich wyznaczenia dla kofeiny w testowanych układach chromatograficznych

	Parametr	TSKgel Amide-80					
		Kofeina		Kwercetyna		Fenol	
		ACN-H <sub>2</sub> O	MeOH-H <sub>2</sub> O	ACN-H <sub>2</sub> O	MeOH-H <sub>2</sub> O	ACN-H <sub>2</sub> O	MeOH-H <sub>2</sub> O
Podziały	p <sub>1</sub>	0,38 ±0,05	0,17 ±0,05	0,39 ±0,20	1,15 ±0,02	-1,28 ±0,12	0,95 ±0,02
	p <sub>2</sub>	1,91 ±0,2	1,03 ±0,3	3,77 ±0,95	0,36 ±0,13	4,15 ±0,47	0,36 ±0,08
	SD	<b>0,06</b>	<b>0,06</b>	<b>0,26</b>	<b>0,03</b>	<b>0,14</b>	<b>0,02</b>
	SUM	<b>0,02</b>	<b>0,02</b>	<b>0,43</b>	<b>8,06·10<sup>-3</sup></b>	<b>0,15</b>	<b>0,004</b>
	Test F	<b>13,68</b>	<b>4,21</b>	<b>3,81</b>	<b>2,35</b>	<b>11,55</b>	<b>3,43</b>
Adsorpcyj- ny	p <sub>1</sub>	-0,61 ±0,02	-0,37 ±0,04	-1,67 ±0,11	0,94 ±0,02	-3,46 ±0,07	0,75 ±0,01
	p <sub>2</sub>	0,34 ±0,01	0,19 ±0,02	0,73 ±0,06	0,07 ±0,01	0,74 ±0,04	0,07 ±8,15·10 <sup>-3</sup>
	SD	<b>0,03</b>	<b>0,04</b>	<b>0,11</b>	<b>0,02</b>	<b>0,07</b>	<b>0,01</b>
	SUM	<b>5,4·10<sup>-3</sup></b>	<b>0,01</b>	<b>0,08</b>	<b>3,85·10<sup>-3</sup></b>	<b>0,03</b>	<b>1,00·10<sup>-3</sup></b>
	Test F	<b>65,43</b>	<b>9,77</b>	<b>19,84</b>	<b>4,91</b>	<b>44,42</b>	<b>11,56</b>
Adsorpcyjno- podziały	p <sub>1</sub>	0,53 ±0,11	0,29 ±0,1	1,07 ±0,32	1,23 ±0,02	-0,92 ±0,11	1,02 ±7,19·10 <sup>-4</sup>
	p <sub>2</sub>	164,5 ±3,34	2,66 ±1,25	195,60 ±12,49	2,74 ±0,26	19,64 ±2,73	8,16 ±1,08
	p <sub>3</sub>	3365 ±17,62	0,23 ±0,03	994,50 ±24,30	1,07 ±0,23	19,64 ±3,77	14,46 ±0,05
	p <sub>4</sub>	0,04 ±0,01	2,5 ±0,003	0,18 ±0,03	1,43 ±0,97	1,07 ±0,13	0,48 ±0,05
	SD	<b>0,04</b>	<b>0,08</b>	<b>0,13</b>	<b>0,01</b>	<b>0,06</b>	<b>3,19·10<sup>-4</sup></b>
	SUM	<b>9,6·10<sup>-3</sup></b>	<b>0,03</b>	<b>0,07</b>	<b>6,88·10<sup>-4</sup></b>	<b>0,01</b>	<b>4,07·10<sup>-7</sup></b>
	Test F	<b>24,55</b>	<b>2,51</b>	<b>15,36</b>	<b>18,36</b>	<b>84,31</b>	<b>2,61·10<sup>4</sup></b>

Analiza otrzymanych doświadczalnie przebiegów zależności współczynnika retencji  $k$  od temperatury wskazuje, iż w większości przypadków przebiegi te mają charakter liniowy. Wysokie wartości współczynnika determinacji  $R^2$  wskazują na dominację podziałowego mechanizmu retencji zarówno dla kolumny aminowej, jak i amidowej w układach zawierających metanol jako komponent organiczny. Silne odstępstwa od liniowości można zaobserwować w układach z acetonitrylem dla kofeiny (90%, kolumna amidowa), kwercetyny (w kolumnie aminowej, 90% acetonitrylu) oraz fenolu (kolumna aminowa, 70% modyfikatora organicznego). Odstępstwa od liniowości mogą świadczyć o złożoności mechanizmu retencji. W tych układach obserwuje się także zmiany zarówno entalpii, jak i entropii wraz ze zmianą temperatury. Zmiany te mogą być spowodowane różnymi czynnikami, np.: (I) przechodzeniem jednego mechanizmu retencji w drugi, wraz ze zmianą temperatury; (II) konformacją ligandów adsorbentu; (III) zmianą grubości zaadsorbowanej wody na powierzchni fazy stacjonarnej. Dodatkowo efekty te mogą ze sobą współlinistnieć, znacząco wpływając na globalny mechanizm retencji w badanych układach. Można zatem stwierdzić, iż zmiana temperatury ma istotny wpływ na procesy sorpcji dla substancji testowych, w zależności od zastosowanego rozpuszczalnika organicznego.



*Analiza mechanizmu retencji kofeiny, kwercetyny oraz fenolu  
w wybranych układach chromatografii oddziaływań hydrofilowych (HILIC)*



Rysunek 6. Zależności van't Hoffa substancji testowych w kolumnach: A – LiChroCART Purospher STAR NH<sub>2</sub>, B – TSKgel Amide-80

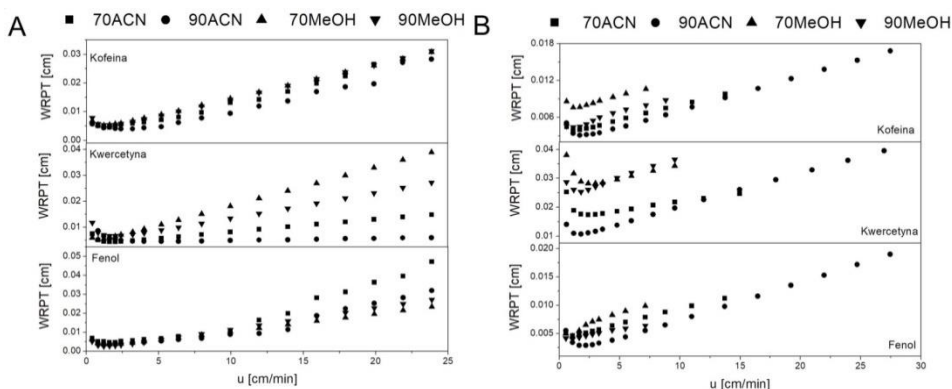
Tabela 2. Wartości entalpii i entropii adsorpcji oraz współczynników determinacji

Analit	ACN–H <sub>2</sub> O 90:10			ACN–H <sub>2</sub> O 70:30			MeOH–H <sub>2</sub> O 90:10			MeOH–H <sub>2</sub> O 70:30		
	$\Delta H$ [kJ/mol]	$\Delta S$ [J/mol·K]	R <sup>2</sup>	$\Delta H$ [kJ/mol]	$\Delta S$ [J/mol·K]	R <sup>2</sup>	$\Delta H$ [kJ/mol]	$\Delta S$ [J/mol·K]	R <sup>2</sup>	$\Delta H$ [kJ/mol]	$\Delta S$ [J/mol·K]	R <sup>2</sup>
<b>LiChroCART Purospher STAR NH<sub>2</sub></b>												
Kofeina	-4,22	-11,73	0,98	-2,76	-9,26	0,99	-3,38	-11,05	0,78	-3,53	-11,62	0,99
Kwercetyna	2,86	13,63	0,50	3,12	10,09	0,98	-2,00	-4,65	0,57	-6,19	-17,29	0,99
Fenol	0,74	-0,87	0,76	0,74	-0,87	0,76	-4,27	-16,06	0,93	-0,96	-5,59	0,88
<b>TSKgel Amide - 80</b>												
Kofeina	-0,88	-2,05	0,11	-2,07	-8,81	0,88	-3,70	-14,78	0,88	-8,06	-28,44	0,91
Kwercetyna	15,63	51,52	0,68	4,51	8,96	0,87	-2,62	-11,16	0,96	-6,00	-21,36	0,97
Fenol	3,46	7,87	0,66	1,20	-2,58	0,23	-3,70	-17,6	0,97	-7,16	-27,48	0,96

## 2.5. Sprawność kolumny chromatograficznej

Zależność van Deemtera dla wszystkich analizowanych substancji oraz zastosowanych faz stacjonarnych w układach zawierających 70% i 90% modyfikatora organicznego przedstawiono na rysunku 7. Porównując wpływ użytego rozpuszczalnika organicznego, uzyskane wyniki wskazują na wysoką sprawność zarówno kolumny aminowej, jak i amidowej w układach bogatszych w modyfikator organiczny, w szczególności przy zastosowaniu acetonitrylu.

Dla wszystkich badanych układów, testowane kolumny osiągają najlepszą sprawność dla prędkości przepływu z zakresu 0,1-4,0 cm/min. Analiza otrzymanych wyników pozwala stwierdzić, iż dla układów, w których substancją testową jest kofeina, obydwie badane kolumny cechuje porównywalna sprawność w zakresie niewielkich prędkości przepływu eluentu. Wraz ze wzrostem liniowej prędkości, największy spadek sprawności obserwuje się dla kolumny LiChroCART Purospher STAR NH<sub>2</sub> (rys. 7 A). W przypadku kwercetyny wyższą sprawność osiągnięto w kolumnie aminowej. Dodatkowo, niezależnie od zastosowanego modyfikatora organicznego, sprawność kolumny jest podobna przy natężeniu przepływu fazy ruchomej w zakresie 0,1-2,5 cm/min. Najmniejszy spadek sprawności wraz ze wzrostem natężenia przepływu eluentu następuje dla układów zawierających acetonitryl. Największy zaś, przy zastosowaniu metanolu. Zupełnie odrębną sytuację obserwuje się dla kolumny TSKgel Amide-80 (rys. 7 B). W podanym zakresie prędkości przepływu fazy ruchomej najlepszą sprawność osiągają układy zawierające acetonitryl (WRPT w granicach 0,01-0,02 cm). Tymczasem dla układów z metanolem najniższą wartość WRPT (0,025 cm) osiągnięto dla układu bogatszego w składnik organiczny. W układach, w których substancją testową był fenol lepszą sprawnością cechowała się kolumna TSKgel Amide-80. Analizując wpływ zwiększenia prędkości przepływu eluentu można stwierdzić, iż dla kolumny amidowej następuje niewielki spadek sprawności. Jednakże wyniki otrzymane dla kolumny aminowej wykazują ciekawą zależność, a mianowicie obserwuje się drastyczny spadek sprawności dla układu zawierającego zarówno 70%, jak i 90% acetonitrylu dla prędkości przepływu z zakresu 10,0-25,0 cm/min. Przy dużych przepływach fazy ruchomej lepszą sprawność obserwuje się w układach zawierających w składzie eluentu metanol.



Rysunek 7. Zależności van Deemtera substancji testowych w kolumnach A – LiChroCART Purospher STAR NH<sub>2</sub>, B – TSKgel Amide-80

### 3. Podsumowanie

W niniejszej pracy przeanalizowano wpływ temperatury, składu fazy ruchomej oraz prędkości przepływu fazy ruchomej na proces retencji kofeiny, kwercetyny oraz fenolu w kolumnach: amidowej TSKgel Amide-80 firmy Tosoh Bioscience oraz aminowej LiChroCART Purospher STAR NH<sub>2</sub> firmy Merck. Przeprowadzona analiza wpływu zawartości modyfikatora fazy ruchomej pozwala stwierdzić, iż globalny mechanizm retencji substancji testowych w badanych kolumnach stanowi połączenie mechanizmów adsorpcyjnego oraz podziałowego w różnych proporcjach. Wnioski te potwierdzają także badania porównawcze dokładności dopasowania teoretycznych modeli retencji, w których najlepszym dopasowaniem charakteryzuje się model adsorpcyjno-podziałowy. Wyniki badań wskazują na istotny wpływ temperatury na retencję wszystkich analizowanych substancji testowych. W zależności od rozpatrywanego układu obserwuje się egzo- lub endotermiczny charakter przebiegu procesu sorpcji. Ponadto obserwuje się zarówno liniowe (świadczące o dominacji pojedynczego mechanizmu), jak i nieliniowe (występowanie zmiany mechanizmu retencji wraz z temperaturą) przebiegi wyznaczonych zależności van't Hoffa. Przeanalizowano także sprawność poszczególnych faz stacjonarnych. Stwierdzono, że obie kolumny charakteryzują się porównywalną sprawnością dla kofeiny oraz fenolu, natomiast przy zastosowaniu kwercetyny lepszą sprawność otrzymano dla kolumny TSKgel Amide-80.

### Literatura

1. Subirat X., Abraham M.H., Roses M., *Characterization of hydrophilic interaction liquid chromatography retention by a linear free energy relationship. Comparison to reversed- and normal-phase retentions*, Anal. Chim. Acta., 1092, 2019, s. 132-143, doi: 10.1016/j.aca.2019.09.010.
2. Buszewski B., Noga S., *Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) – a powerful separation technique*, Anal. and Bioanal. Chem., 402, 2012, s. 231-247.
3. McCalley D.V., *Study of the selectivity, retention mechanism and performance of alternative silica – based stationary phases for separation of ionized solutes in hydrophilic interaction chromatography*, J. Chromatogr. A, 1217, 2010, s. 3408-3417.
4. Logotheti M., Theochari M.K., Kostakis M., Pasiadis I.N., Thomaidis N.S., *Development and validation of a HILIC-UV method for the determination of nucleotides in fish samples*, Food Chem., 248, 2018, s. 70-77, doi: 10.1016/j.foodchem.2017.12.040.
5. Costa P.P.K.G., Mendes T.D., Salum T.F.C., Pacheco T.F., Braga S.C., de Almeida J.R.M., Gonçalves S.B., Damaso M.C.T., Rodrigues C.M., *Development and validation of HILIC-UHPLC-ELSD methods for determination of sugar alcohols stereoisomers and its application for bioconversion processes of crude glycerin*, J Chromatogr A, 1589, 2019, s. 56-64, doi: 10.1016/j.chroma.2018.12.044.
6. Alvarez-Segura T., Subirats X., Rosés M., *Retention-pH profiles of acids and bases in hydrophilic interaction liquid chromatography*, Anal. Chim. Acta, 1050, 2019, s. 176-184, doi: 10.1016/j.aca.2018.11.021.
7. Prakash N., Ashutosh G., Abhijeet K.S., *A novel hydrophilic interaction liquid chromatography method for the analysis of arterolane; Isolation and structural elucidation of its major degradation product by LC-HRMS and NMR*, J. Pharm. and Biomedic. Anal., 186, 2020, s. 113279.
8. Jandera P., Janás P., *Recent advances in stationary phases and understanding of retention in hydrophilic interaction chromatography. A review*, Anal. Chimic. Acta, 2017, doi: 10.1016/j.aca.2017.01.060.

9. Kartsova L.A., Bessonova E.A., Somovaa V.D., *Hydrophilic Interaction Chromatography*, J. Anal. Chem., 74, 2019, s. 415-424.
10. Guo Y., Gaiki S., *Retention and selectivity of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography*, J. Chromatogr. A, 1218(35), 2011, s. 5920-5938, doi: 10.1016/j.chroma.2011.06.052.
11. Subirats X., Abraham M.H., Roses M., *Characterization of hydrophilic interaction liquid chromatography retention by a linear free energy relationship. Comparison to reversed – and normal-phase retentions*, Anal. Chim. Acta, 1092, 2019, s. 132-143.
12. Vallaro M., Ermondi G., Caron G., *Chromatographic HILIC indexes to characterize the lipophilicity of Zwitterions*, Eur. J. Pharm. Sci., 145, 2020, s. 105232, doi: 10.1016/j.ejps.2020.105232.
13. Sentkowska A., Biesaga M., Pyrzynska K., *Application of Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography for the Quantification of Flavonoids in Genista tinctoria. Extract*, J. Anal. Methods Chem., 2016, doi: 10.1155/2016/3789348.
14. McCalley D.V., *Study of the selectivity, retention mechanism and performance of alternative silica-based stationary phases for separation of ionized solutes in hydrophilic interaction chromatography*, J. Chromatogr. A, 1217, 2010, s. 3408-3417.
15. Ogden P.B., I., Coym J.W., *Retention mechanism of a cholesterol-coated C18 stationary phase: van't Hoff and Linear Solvation Energy Relationships (LSER) approaches*, J. Chromatogr. A, 1218, 2011, s. 2936–2943.
16. Tchaplá A., Heron S., Cohn H., Guiochon G., *Role of temperature in the behavior of a homologous series in reversed phase liquid chromatography*, Anal. Chem., 60, 1988, s. 1443-1448.
17. Panella C., Ferretti R., Casulli A., Cirilli R., *Temperature and eluent composition effects on enantiomer separation of carvedilol by high-performance liquid chromatography on immobilized amylose-based chiral stationary phases*, J. Pharm. Anal., 9, 2019, s. 324-331.
18. Lundanes E., Greibrokk T., *Temperature effects in liquid chromatography*, Adv. Chromatogr., 44, 2006, s. 45-77.
19. Gritti F., Guiochon G., *The van Deemter equation: Assumptions, limits, and adjustment to modern high performance liquid chromatography*, J. Chromatogr. A, 1302, 2013, s. 1-13.
20. Ismail O. H., Antonelli M., Ciogli A., Villani C., Cavazzini A., Catani M., Felletti S., Bell D. S., Gasparini F., *New perspectives in high efficient and ultrafast chiral liquid chromatography through zwitterionic teicoplanin-based 2-micron superficially porous particles*, J. Chromatogr. A, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2017.09.008>.
21. Asnina L.D., Botevaa A.A., Krasnykha O.P., Stepanovaa M.V., Ali I., *Unusual van Deemter plots of optical isomers on a chiral brush-type liquid chromatography column*, J. Chromatogr. A, 1592, 2019, s. 112-121.
22. Snyder L.R., Dolan J.W., Gant J.R., *Gradient elution in high-performance liquid chromatography. Theoretical basis for reversed-phase systems*, J. Chromatogr. A, 165, 1979, s. 3-30.
23. Hemström P., Irgum K., *Hydrophilic interaction chromatography*, J. Sep. Sci., 29, 2006, s. 1784-1821.
24. Jovanovic M., Jancic Stojanovic B., *Thorough investigation of the retention mechanisms and retention behavior of amides and sulfonamides on amino column in hydrophilic interaction liquid chromatography*, J. Chromatogr. A, 1301, 2013, s. 27-37.
25. Jandera P., Hajek T., *Utilization of dual retention mechanism on columns with bonded PEG and diol stationary phases for adjusting the separation selectivity of phenolic and flavon natural antioxidants*, J. Sp. Sci., 32, 2009, s. 3603-3619.

## **Analiza mechanizmu retencji kofeiny, kwercetyny oraz fenolu w wybranych układach chromatografii oddziaływań hydrofilowych (HILIC)**

### Streszczenie

Przeanalizowano mechanizm sorpcji trzech substancji testowych: kofeiny, kwercetyny oraz fenolu w różnych układach chromatograficznych. W badaniach wykorzystano kolumny chromatograficzne wypełnione polarnymi fazami stacjonarnymi: amidową oraz aminową. Fazę ruchomą stanowiły mieszaniny wody oraz modyfikatora organicznego (acetonitryl oraz metanol) w różnych proporcjach. Zbadano wpływ składu fazy ruchomej oraz temperatury na proces retencji substancji testowych. Wyniki badań wskazują na złożoność mechanizmu retencji wynikającą z występowania różnych oddziaływań badanych substancji z badanymi fazami stacjonarnymi. Na podstawie uzyskanych zależności van Deemtera dokonano także oceny sprawności poszczególnych kolumn.

Słowa kluczowe: HILIC, retencja, temperatura kolumny, sprawność kolumny

## **Analysis of the retention mechanism of caffeine, quercetin and phenol in selected hydrophilic interaction chromatography (HILIC) systems**

### Abstract

The sorption mechanism of three test substances: caffeine, quercetin and phenol in various chromatographic systems was analyzed. The research used chromatographic columns filled with polar stationary phases: amide and amine. The mobile phase consisted of mixtures of water and an organic modifier (acetonitrile and methanol) in various proportions. The influence of the composition of the mobile phase and temperature on the retention process of the tested substances was investigated. The results of the research indicate the complexity of the retention mechanism resulting from the occurrence of different interactions of the tested substances with the applied stationary phases. Based on the obtained van Deemter relations, the efficiency of individual columns was also assessed.

Keywords: HILIC, retention, column temperature, column efficiency

## Wpływ temperatury na wolne rodniki biopolimeru melaninowego z *Sepia officinalis*

### 1. Wstęp

Melaniny są szeroko rozpowszechnionymi w przyrodzie pigmentami koloru czarnego, brązowego, żółto-czerwonego [1-3]. Występują u człowieka, zwierząt i roślin. Spotykane są również u wielu gatunków grzybów, m.in.: *Cladosporium cladosporioides*, *Ochroconis lascauxensis*, *Ochroconis anomala*, *Aspergillus nidulans*, *Auricularia auricula*, *Gliocephalotrichum simplex*, a także u bakterii, m.in. *Pseudomonas stutzeri*, *Streptomyces parvus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus weihenstephanensis* [4-13].

Melaniny wykorzystywane są w medycynie, biotechnologii, przemyśle spożywczym, a także przy usuwaniu metali ciężkich [1-4, 9, 10, 13, 14]. W kosmetologii wykorzystuje się je do produkcji preparatów samoopalających, farb do włosów, kremów i preparatów chroniących przed promieniowaniem ultrafioletowym [15, 16]. Głównym źródłem pozyskiwania melanin są przede wszystkim mątwy, kałamarnice, pióra oraz wełna czarnych owiec. Barwnik otrzymywany z woreczka czernidłowego mątwy pospolitej (*Sepia officinalis*) jest powszechnie używanym wzorcem pigmentu eumelaninowego. Sepiomelanina jest pigmentem dobrze scharakteryzowanym, o wysokiej czystości, co sprawia, że stosowana jest w licznych badaniach właściwości fizykochemicznych melanin [1, 3, 15, 17]. Z uwagi na wysoki koszt uzyskania naturalnych melanin ciągle poszukiwane są nowe źródła melaniny. Są nimi melaniny syntetyczne, a także syntetyzujące melaninę grzyby i bakterie [4, 13-15].

Poza wpływem na barwę skóry, włosów, oczu, sierści i piór u zwierząt, melaniny pełnią wiele istotnych funkcji [1, 4]. Większość z nich związana jest z ochroną przed niekorzystnym działaniem czynników zewnętrznych. Jest to między innymi ochrona przed szkodliwymi reaktywnymi formami tlenu i wolnymi rodnikami [1-4, 18-20]. Melaniny są również naturalnym filtrem chroniącym komórki przed destrukcyjnym działaniem promieniowania ultrafioletowego – dzięki zdolności biopolimeru do absorpcji i rozpraszania promieniowania elektromagnetycznego [1, 4, 20, 21]. Biopolimery melaninowe pełnią także funkcje detoksykacyjne. Poprzez wiązanie jonów metali oraz substancji leczniczych melanina chroni komórki przed ich potencjalnie toksycznym działaniem. Długotrwała kumulacja ksenobiotyków może jednak powodować zwiększenie ilości wolnych rodników, a tym samym uszkodzenie komórek upigmentowanych [4, 20-25].

Melaniny pełnią w organizmie ważne funkcje, które wynikają przede wszystkim z właściwości fizykochemicznych biopolimeru. Melaniny z uwagi na złożoną budowę oraz obecność w polimerze grup reaktywnych charakteryzują się szeregiem właściwo-

---

<sup>1</sup> mzdzybel@sum.edu.pl, Katedra i Zakład Biofizyki, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.sum.edu.pl.

<sup>2</sup> orlickiadam@gmail.com, absolwent Wydziału Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.sum.edu.pl

(autor korespondencyjny: Magdalena Zdybel, mzdzybel@sum.edu.pl).

ści do których należą m.in.: zdolność do przewodnictwa i półprzewodnictwa elektrycznego, zdolność absorpcji promieniowania elektromagnetycznego z zakresu ultrafioletu, światła widzialnego i podczerwieni, zdolność oddziaływania z jonami metali i substancjami leczniczymi oraz trwały i silny paramagnetyzm, wynikający z obecności w strukturze polimeru o-semichinonowych wolnych rodników [1, 2, 4, 18, 20, 26].

Dzięki obecności wolnych rodników, w których niesparowane elektrony zlokalizowane są na o-semichinonowych grupach indolowych stanowiących podjednostki polimeru – w badaniach melanin stosowana jest spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) [1, 4, 5, 20, 21, 24-30]. Spektroskopia EPR wykorzystywana jest do wykrywania biopolimerów melaninowych, a także do wyznaczenia rodzaju pigmentu (eumelaniny lub feomelaniny) występującego w próbce na podstawie otrzymanego widma EPR [4, 20, 26]. Dostarcza ona informacji o właściwościach i koncentracji wolnych rodników występujących zarówno w melaninach syntetycznych, jak i w melaninach pochodzących z próbek naturalnych. Stosowana jest w badaniach ilościowych i jakościowych centrów paramagnetycznych, a także w celu określenia wpływu różnych czynników fizycznych i chemicznych na wolne rodniki biopolimeru [4, 20, 31]. Czynniki fizykochemiczne, takie jak pH, temperatura, nawodnienie, promieniowanie elektromagnetyczne, molekuly tlenu, jony metali, substancje lecznicze – poprzez oddziaływanie na melaninę – mogą powodować zmiany właściwości i koncentracji wolnych rodników pigmentu, co może wpływać na biologiczne funkcje melaniny [4, 20, 31].

## 2. Cel pracy

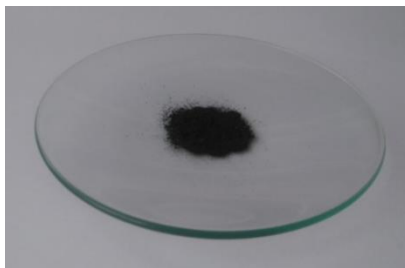
Celem pracy było zbadanie wpływu temperatury na wolne rodniki modelowej melaniny z *Sepia officinalis* za pomocą spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR).

Dokonano oceny wpływu temperatury 40°C i 50°C na właściwości paramagnetyczne melaniny z *Sepia officinalis*. Analizowano sposób rozmieszczenia (jednorodny, niejednorodny) wolnych rodników w badanych próbkach.

## 3. Materiały i metody

### 3.1. Charakterystyka badanych próbek

W pracy zbadano wpływ temperatury na wolne rodniki biopolimeru melaninowego. Badaniom poddano zakupioną w Sigma-Aldrich naturalną melaninę z *Sepia officinalis*, która stanowi komercyjnie dostępny wzorzec pigmentu eumelaninowego. Ma ona postać czarnego proszku (rys. 1).



Rysunek 1. Melanina z *Sepia officinalis* [opracowanie własne]

Przed przystąpieniem do pomiarów melaninę z *Sepia officinalis* umieszczono w cienkościennych kapilarach o średnicy 1 mm, przeznaczonych do pomiarów EPR. Masę próbek wyznaczono za pomocą wagi Sartorius – jako różnicę pomiędzy masą kapilary z melaniną a masą pustej rurki pomiarowej. Próbki melaninowe badano w środowisku wodnym. W celu wyznaczenia wpływu temperatury na centra paramagnetyczne badanego biopolimeru melaninę poddano działaniu temperatury 40°C oraz 50°C w sterylizatorze termicznym z wymuszonym obiegiem powietrza firmy Memmert (Niemcy). Zastosowano dwa czasy działania czynnika termicznego: 30 minut oraz 60 minut. Próbki melaniny z *Sepia officinalis* przed ogrzewaniem oraz w trakcie działania czynnika termicznego znajdowały się w środowisku wodnym.

Otrzymane próbki – melaninę z *Sepia officinalis* w środowisku wodnym, melaninę z *Sepia officinalis* w środowisku wodnym ogrzewaną w temperaturze 40°C przez 30 minut oraz 60 minut, melaninę z *Sepia officinalis* w środowisku wodnym ogrzewaną w temperaturze 50°C przez 30 minut oraz 60 minut – poddano badaniom z wykorzystaniem spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR).

### 3.2. Pomiary z zastosowaniem spektroskopii EPR

Spektroskopia EPR to bezpośrednia metoda badania centrów paramagnetycznych [4, 32]. Dostarcza ona informacji o centrach paramagnetycznych na podstawie absorpcji promieniowania mikrofalowego przez niesparowane elektrony [32]. Do badania wpływu temperatury na wolne rodniki biopolimeru melaninowego z *Sepia officinalis* wykorzystano spektrometr elektronowego rezonansu paramagnetycznego na pasmo X (9.3 GHz) firmy Radiopan (Poznań) oraz współpracujący z nim system numerycznej akwizycji danych Rapid Scan Unit firmy Jagmar (Kraków). Przedstawia je rysunek 2. Modulacja pola magnetycznego wynosiła 100 kHz.

Podczas pomiarów z wykorzystaniem spektroskopii EPR badane próbki melaninowe umieszczano pomiędzy biegunami elektromagnesu we wnęce rezonansowej spektrometru, do której falowodem dostarczano promieniowanie mikrofalowe, a następnie rejestrowano widma EPR.



Rysunek 2. Spektrometr EPR na pasmo X firmy Radiopan. Katedra i Zakład Biofizyki w Sosnowcu [opracowanie własne]

Widma EPR próbek melaninowych rejestrowano w temperaturze pokojowej, w postaci pierwszej pochodnej krzywej absorpcji. Podczas pomiarów stosowano szeroki zakres mocy mikrofalowych (2.2-70 mW). Do rejestracji oraz analizy widm EPR wykorzystano programy spektroskopowe firmy Jagmar, program LabVIEW 8.5 firmy National Instruments, Origin 2016 firmy OriginLab.



### 3.2.1. Analiza parametrów widm EPR

W pracy wyznaczono następujące parametry widm EPR:

- amplitudę (A) linii EPR [j. wzgl.];
- szerokość ( $\Delta B_{pp}$ ) linii EPR [mT];
- współczynnik rozszczepienia spektroskopowego g.

Parametry te dostarczają informacji na temat rodzaju i właściwości wolnych rodników występujących w badanych próbkach [32]. Amplituda rośnie wraz ze wzrostem ilości wolnych rodników w próbce [32-35]. Szerokość linii EPR informuje o rodzaju oddziaływań magnetycznych pomiędzy niesparowanymi elektronami. Oddziaływania dipolowe wpływają na poszerzenie linii EPR, natomiast oddziaływania wymienne na zmniejszenie szerokości linii [32-35]. Współczynnik rozszczepienia spektroskopowego g dostarcza informacji o rodzaju atomu, na którym znajduje się niesparowany elektron. Wyznaczany jest on z następującego wzoru [33, 34]:

$$g = h\nu / \mu_B B_r \quad (1)$$

gdzie: h – stała Plancka,  $\nu$  – częstotliwość promieniowania mikrofalowego,  $\mu_B$  – magneton Bohra,  $B_r$  – rezonansowa indukcja magnetyczna.

W celu określenia sposobu rozmieszczenia wolnych rodników w próbkach (jednorodny, niejednorodny), a także szybkości procesów relaksacji spin-sieć analizie poddano wpływ mocy mikrofalowej na amplitudę i szerokość linii EPR.

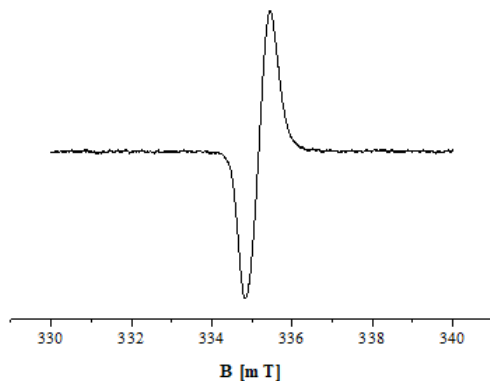
W przypadku linii poszerzonej jednorodnie amplituda linii EPR rośnie wraz ze wzrostem mocy mikrofalowej, osiąga wartość maksymalną, a następnie maleje [32, 33]. Szerokość linii EPR poszerzonej jednorodnie stale rośnie wraz ze wzrostem mocy mikrofalowej [33]. W przypadku linii poszerzonej niejednorodnie amplituda linii EPR po początkowym wzroście i osiągnięciu wartości maksymalnej nie zmienia się wraz ze wzrostem mocy mikrofalowej. Szerokość linii EPR poszerzonej niejednorodnie nie zależy od mocy mikrofalowej [32, 33].

Moc nasycenia mikrofalowego linii EPR rośnie dla szybkich procesów relaksacji spin-sieć i krótkich czasów relaksacji spin-sieć w próbce. W przypadku wolnych procesów relaksacji spin-sieć i długich czasów relaksacji spin-sieć nasycenie linii EPR następuje przy niskich wartościach mocy mikrofalowej [33, 34].

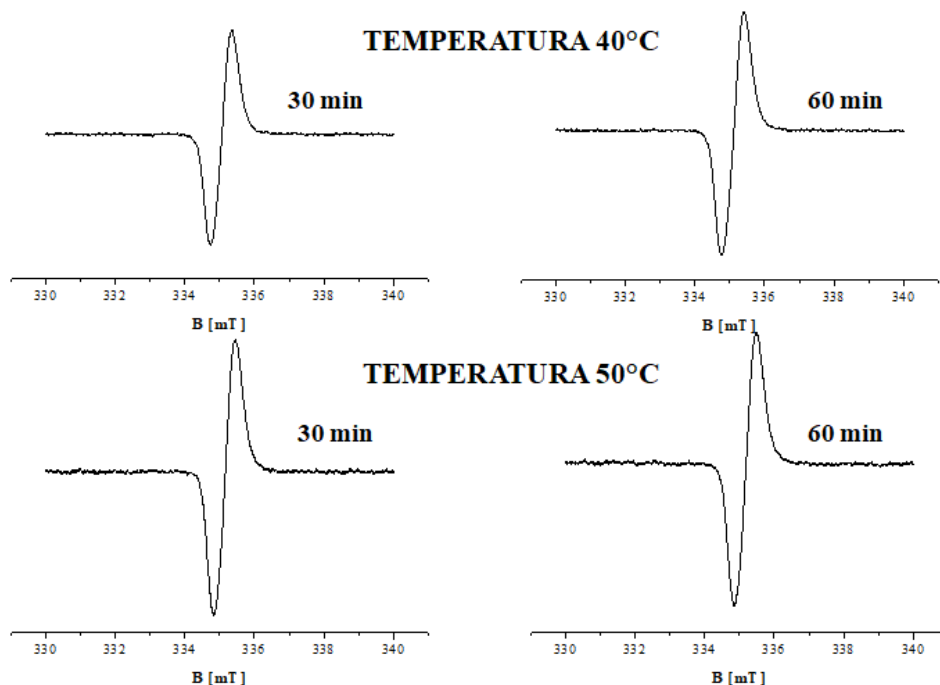
## 4. Wyniki i dyskusja

Dla badanych próbek rejestrowano silne sygnały EPR w całym zakresie stosowanej mocy mikrofalowej. Zarejestrowane w temperaturze pokojowej przy tłumieniu 15 dB widma EPR melaniny z *Sepia officinalis* w środowisku wodnym, melaniny z *Sepia officinalis* w środowisku wodnym ogrzewanej w temperaturze 40°C i 50°C przez 30 oraz 60 minut przedstawiono odpowiednio na rysunkach 3 i 4. W przypadku wszystkich badanych próbek zarejestrowano pojedynczą, asymetryczną linię EPR, typową dla eumelaniny. Widma EPR miały podobny kształt, zbliżony do widm EPR DOPA-melaniny (modelowej eumelaniny) [24, 25, 36-41]. W widmach tych nie zaobserwowano struktury nadsztywnej charakterystycznej dla feomelaniny, nawet w przypadku widm rejestrowanych przy niskich wartościach tłumienia, co przedstawiono na rysunku 5. Złożony kształt widm EPR, typowy dla feomelaniny, rejestrowano przy niskich wartościach tłumienia w przypadku upigmentowanych grzybów glebowych *Cladosporium*

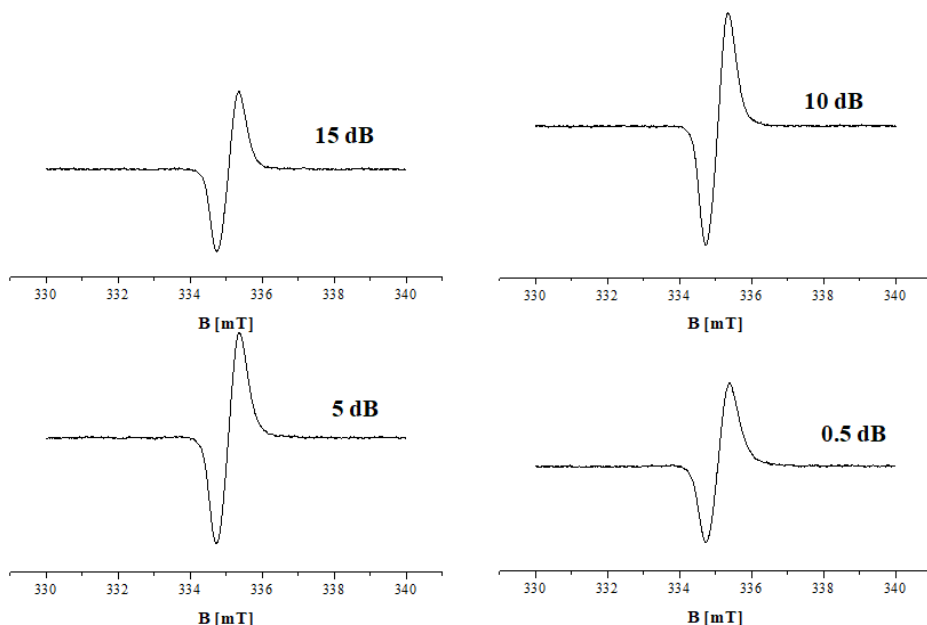
*cladosporioides*, co może świadczyć o występowaniu w badanych grzybach zarówno eumelaniny, jak i feomelaniny [5, 42]. W melaninie z *Sepia officinalis*, a także w melaninie z *Sepia officinalis* poddanej działaniu temperatury występuje eumelanina. Wyniki te są zgodne z pracami, które wskazują, że melanina wyizolowana z *Sepia officinalis* jest eumelaniną [17, 31, 43-45].



Rysunek 3. Widmo EPR melaniny z *Sepia officinalis* zarejestrowane przy tłumieniu 15 dB. B – indukcja pola magnetycznego [opracowanie własne]



Rysunek 4. Widma EPR melaniny z *Sepia officinalis* ogrzewanej w temperaturze 40°C i 50°C przez 30 minut oraz 60 minut zarejestrowane przy tłumieniu 15 dB. B – indukcja pola magnetycznego [opracowanie własne]



Rysunek 5. Widma EPR melaniny z *Sepia officinalis* ogrzewanej w temperaturze 40°C przez 30 minut zarejestrowane przy tłumieniu 15 dB, 10 dB, 5 dB oraz 0,5 dB. B – indukcja pola magnetycznego [opracowanie własne]

Szerokość ( $\Delta B_{pp}$ ) linii EPR oraz współczynnik rozszczepienia spektroskopowego  $g$  dla badanych próbek porównano w tabeli 1. Otrzymane wartości współczynnika rozszczepienia spektroskopowego  $g$  z zakresu 2.0045-2.0053 świadczą o występowaniu w melaninie z *Sepia officinalis* (podobnie jak w melaninie poddanej działaniu temperatury 40°C i 50°C) *o*-semichinonowych wolnych rodników. Obecność *o*-semichinonowych wolnych rodników o podobnych wartościach współczynnika rozszczepienia spektroskopowego  $g$  zaobserwowano również w przypadku syntetycznej DOPA-melaniny, feomelaniny, kompleksów DOPA-melaniny z jonami metali, kompleksów grzybni *Cladosporium cladosporioides* z amfoterycyną B, melaniny z *Sepia officinalis* poddanej działaniu promieniowania UV oraz melaniny wyizolowanej z komórek czerniaka linii A-375 [5, 38, 40, 41, 45].

W przypadku wszystkich badanych próbek uzyskano szerokie widma EPR o szerokości linii EPR wynoszącej od 0,61 mT do 0,63 mT (tab. 1), co świadczy o silnych oddziaływaniach dipolowych, które zachodzą w przypadku wolnych rodników położonych w niewielkich odległościach od siebie [32, 33].

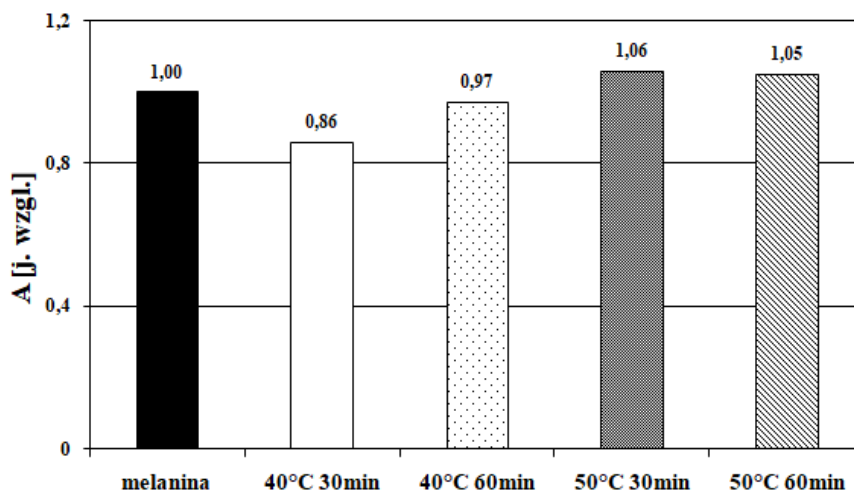
Tabela 1. Współczynnik rozszczepienia spektroskopowego  $g$  oraz szerokość ( $\Delta B_{pp}$ ) linii EPR melaniny z *Sepia officinalis* oraz melaniny z *Sepia officinalis* ogrzewanej w temperaturze 40°C i 50°C przez 30 minut oraz 60 minut zarejestrowane przy tłumieniu 15 dB

Próbka	$g \pm 0,0002$	$\Delta B_{pp}$ [mT] $\pm 0,02$
melanina	2,0047	0,61
melanina ogrzewana w temperaturze 40°C przez 30 min	2,0053	0,62

melanina ogrzewana w temperaturze 40°C przez 60 min	2,0050	0,63
melanina ogrzewana w temperaturze 50°C przez 30 min	2,0047	0,61
melanina ogrzewana w temperaturze 50°C przez 60 min	2,0045	0,63

Źródło: opracowanie własne.

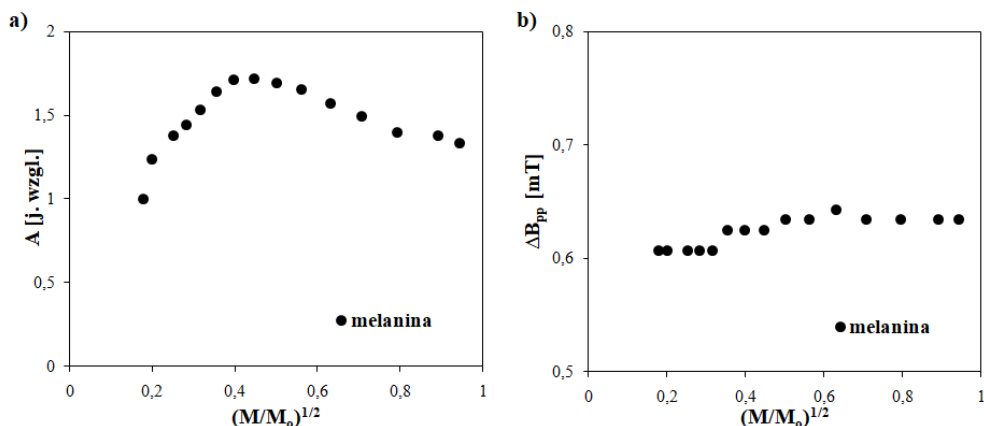
Na rysunku 6 przedstawiono porównanie amplitud (A) linii EPR badanych próbek, które wyznaczono przy tłumieniu 15 dB. Pod wpływem temperatury działającej na melaninę z *Sepia officinalis* amplituda linii EPR ulega zmianie i zależy od wysokości działającej temperatury. W przypadku próbek ogrzewanych w temperaturze 40°C przez 30 oraz 60 minut amplituda była niższa niż w melaninie z *Sepia officinalis* nie poddanej działaniu temperatury. Zaobserwowano, że na właściwości paramagnetyczne melaniny ma również wpływ czas trwania ogrzewania. Wydłużenie czasu ogrzewania spowodowało wzrost amplitudy. Odmienne charakter zmiany uzyskano w przypadku temperatury 50°C, dla której obserwowano wyższe wartości amplitudy linii EPR w porównaniu z melaniną nie poddaną działaniu temperatury (rys. 6). Zmiany w wartościach amplitudy obserwowano także w przypadku oddziaływania na melaninę innych czynników fizykochemicznych, takich jak promieniowanie gamma, promieniowanie ultrafioletowe, molekuly tlenu, jony metali oraz substancje lecznicze [21, 24, 36, 37, 45-48].



Rysunek 6. Amplituda (A) linii EPR melaniny z *Sepia officinalis* oraz melaniny z *Sepia officinalis* ogrzewanej w temperaturze 40°C i 50°C przez 30 minut oraz 60 minut zarejestrowana przy tłumieniu 15 dB [opracowanie własne]

Wyznaczone parametry widm EPR (amplituda i szerokość) zależą od mocy mikrofalowej stosowanej w trakcie pomiaru [33, 34]. Wpływ mocy mikrofalowej na ampli-

tudę (A) i szerokość ( $\Delta B_{pp}$ ) linii EPR melaniny z *Sepia officinalis* przedstawiono na rysunku 7. Wraz ze wzrostem mocy mikrofalowej szerokość linii EPR – w przypadku badanej melaniny – rośnie. Amplituda natomiast rośnie, a następnie ulega zmniejszeniu. Uzyskany charakter zmian świadczy o jednorodnym poszerzeniu linii EPR melaniny z *Sepia officinalis*.



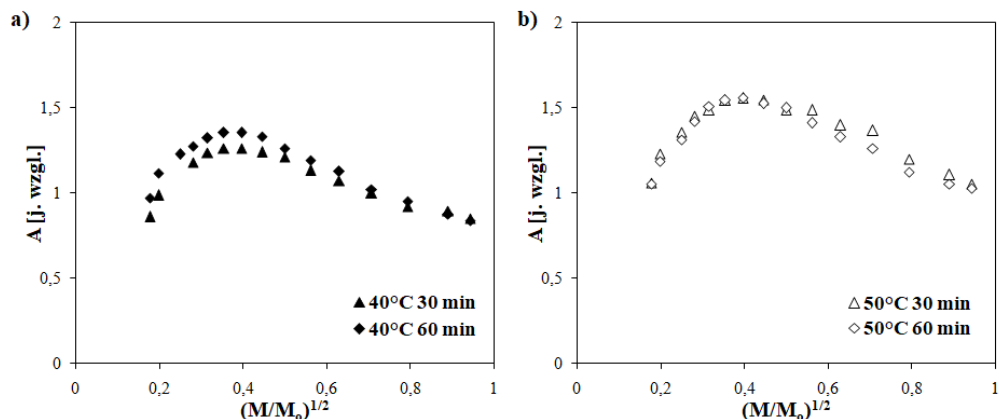
Rysunek 7. Wpływ mocy mikrofalowej na amplitudę (A) (a) i szerokość ( $\Delta B_{pp}$ ) (b) linii EPR melaniny z *Sepia officinalis*. M – moc promieniowania mikrofalowego stosowana podczas pomiaru EPR.  $M_0$  – całkowita moc promieniowania mikrofalowego wytwarzana przez klitron (70 mW) [opracowanie własne]

Podobny charakter zmian uzyskano w przypadku melaniny z *Sepia officinalis* ogrzewanej w temperaturze 40°C i 50°C przez 30 oraz 60 minut (rys. 8-10). Wolne rodniki w badanych próbkach rozmieszczone są jednorodnie i nie tworzą tzw. pakietów spinowych. Temperatura oddziaływała na całą objętość próbki. Jednorodne poszerzenie linii EPR obserwowano również w przypadku melanin syntetycznych, kompleksów melanin z jonami metali i substancjami leczniczymi, melanocytów prawidłowych oraz komórek czerniaka złośliwego [5, 24, 25, 28, 30, 31, 36-40, 49-51].

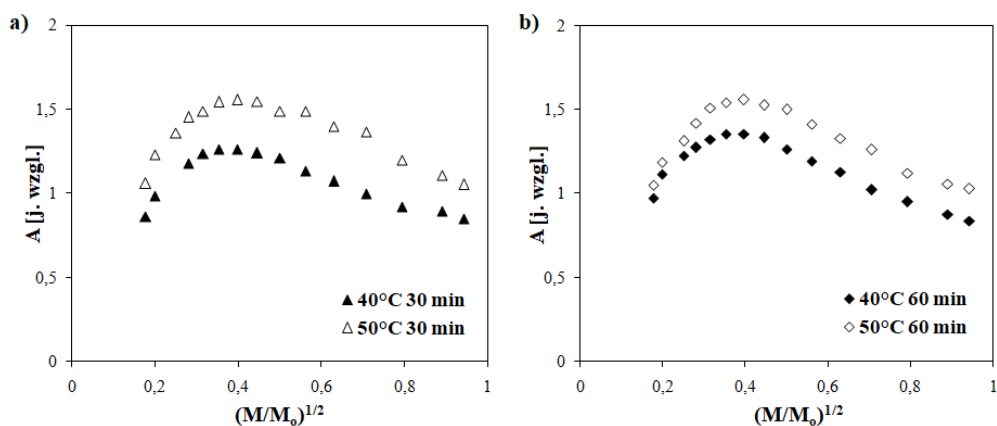
W przypadku melaniny z *Sepia officinalis* ogrzewanej w temperaturze 50°C, w porównaniu z temperaturą 40°C (rys. 6, 9), obserwowano wyższe wartości amplitudy linii EPR, co świadczy o większej ilości wolnych rodników [32, 33]. Wzrost temperatury powodował zwiększenie ilości centrów paramagnetycznych w biopolimerze melaninowym z *Sepia officinalis* zarówno w przypadku 30-minutowego, jak i 60-minutowego czasu ogrzewania próbki (rysunek 6, 9).

Amplitudy linii EPR melaniny z *Sepia officinalis* oraz melaniny z *Sepia officinalis* ogrzewanej w temperaturze 40°C i 50°C przez 30 oraz 60 minut nasycają się przy niskich wartościach mocy mikrofalowej (rys. 7-9), co wskazuje na wolne procesy relaksacji spin-sieć w badanych próbkach oraz długie czasy relaksacji spin-sieć. Podobne zależności obserwowano również dla melaniny z *Sepia officinalis* poddanej ekspozycji na promieniowanie UV, grzybni *Cladosporium cladosporioides*, melaniny wyizolowanej z *Bacillus weihenstephanensis* oraz *Drosophila melanogaster*, w przeciwieństwie do komórek czerniaka złośliwego linii A-2058 oraz A-375, w przypadku których występowały szybkie procesy relaksacji spin-sieć [5, 30, 42, 45, 50-53]. W przypadku melaniny z *Sepia officinalis* ogrzanie próbki powodowało niewielkie

przesunięcie efektu nasycenia mikrofalowego ku niższym mocom mikrofalowym, a tym samym wydłużenie czasu relaksacji spin-sieć (rys. 7, 8).

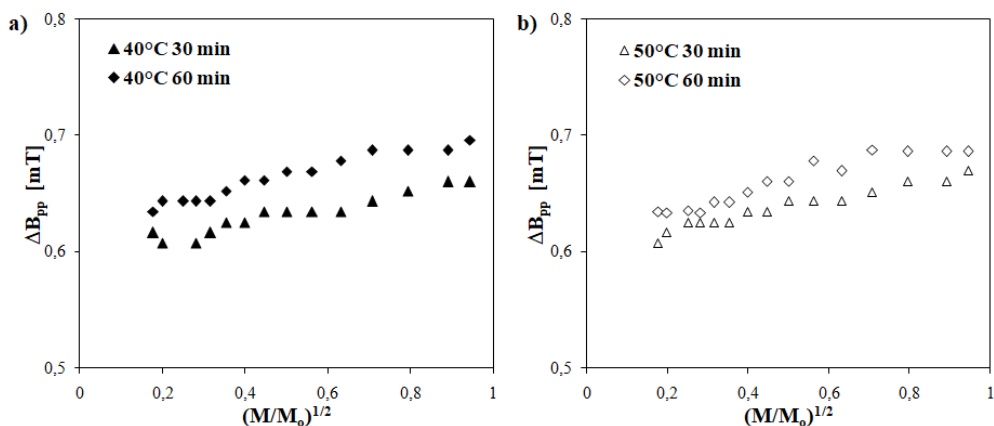


Rysunek 8. Wpływ mocy mikrofalowej na amplitudę (A) linii EPR melaniny z *Sepia officinalis* ogrzewanej w temperaturze 40°C (a) i 50°C (b) przez 30 minut oraz 60 minut. M – moc promieniowania mikrofalowego stosowana podczas pomiaru EPR.  $M_0$  – całkowita moc promieniowania mikrofalowego wytwarzana przez kłistron (70 mW) [opracowanie własne]



Rysunek 9. Wpływ mocy mikrofalowej na amplitudę (A) linii EPR melaniny z *Sepia officinalis* ogrzewanej w temperaturze 40°C i 50°C przez 30 minut (a) oraz 60 minut (b). M – moc promieniowania mikrofalowego stosowana podczas pomiaru EPR.  $M_0$  – całkowita moc promieniowania mikrofalowego wytwarzana przez kłistron (70 mW) [opracowanie własne]

Wolne rodniki w badanych próbkach rozmieszczone są jednorodnie, o czym świadczy również przedstawiony na rysunku 10 charakter zmian szerokości linii EPR z mocą mikrofalową. W przypadku melaniny z *Sepia officinalis* ogrzewanej w temperaturze 40°C i 50°C przez 30 oraz 60 minut obserwowano wzrost szerokości linii EPR w całym zakresie stosowanej mocy mikrofalowej.



Rysunek 10. Wpływ mocy mikrofalowej na szerokość ( $\Delta B_{pp}$ ) linii EPR melaniny z *Sepia officinalis* ogrzewanej w temperaturze 40°C (a) i 50°C (b) przez 30 minut oraz 60 minut. M – moc promieniowania mikrofalowego stosowana podczas pomiaru EPR.  $M_0$  – całkowita moc promieniowania mikrofalowego wytwarzana przez klustron (70 mW) [opracowanie własne]

Wykonane badania pozwoliły na określenie rodzaju pigmentu występującego w melaninie z *Sepia officinalis* oraz na zbadanie wpływu temperatury na właściwości wolnych rodników badanego biopolimeru melaninowego za pomocą spektroskopii EPR. Temperatura działając na melaninę powodowała zmianę jej właściwości paramagnetycznych, co może mieć odzwierciedlenie w modyfikacji biologicznych funkcji melaniny. Wyniki te są istotne z uwagi na coraz szersze zastosowania biopolimeru melaninowego.

## 5. Wnioski

Przeprowadzone badania wpływu temperatury na wolne rodniki biopolimeru melaninowego z *Sepia officinalis* za pomocą spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) wykazały, że:

1. o-Semichinonowe wolne rodniki występują w badanych próbkach melaninowych, o czym świadczą uzyskane wartości współczynnika rozszczepienia spektroskopowego  $g$ .
2. W melaninie poddanej działaniu temperatury występują silne oddziaływania dipolowe charakterystyczne dla niewielkich odległości pomiędzy wolnymi rodnikami, na co wskazują otrzymane wysokie wartości szerokości linii EPR.
3. Wolne rodniki w próbkach rozmieszczone są jednorodnie. Świadczy o tym uzyskany charakter zmian amplitudy i szerokości linii EPR z mocą mikrofalową.
4. Wolne procesy relaksacji spin-sieć zachodzą w próbkach, ponieważ linie EPR melaniny z *Sepia officinalis* poddanej działaniu temperatury nasycają się przy niskich wartościach mocy mikrofalowych.
5. Temperatura oddziałując na melaninę z *Sepia officinalis* prowadzi do zmiany jej właściwości paramagnetycznych, przez co może wpływać na biologiczne funkcje biopolimeru melaninowego.
6. Spektroskopia EPR jest przydatnym narzędziem do badania wpływu temperatury na wolne rodniki melaniny.

## Podziękowania

Praca finansowana przez Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, częściowo z umowy nr PCN-1-058/K/1/F.

## Literatura

1. Łopusiewicz Ł., Lisiecki S., *Czarne złoto – melaniny w życiu człowieka*, Kosmos, 65, 2016, s. 621-629.
2. Rzepka Z., Buszman E., Beberok A., Wrześniok D., *Od tyrozyny do melaniny: ścieżki sygnalizacyjne i czynniki regulujące melanogenezę*, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 70, 2016, s. 695-708.
3. Łopusiewicz Ł., Lisiecki S., *Melaniny w diecie człowieka*, Kosmos, 67, 2018, s. 555-563.
4. Pęszor W., Zdybel M., *Techniki stosowane w badaniach melanin*, [w:] Pilarz Ł.B. (red.), *Wybrane problemy i rozwiązania w medycynie – przegląd zagadnień*, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, Lublin 2021.
5. Zdybel M., Pilawa B., Buszman E., Witoszyńska T., *EPR studies Cladosporium cladosporioides complexes with amphotericin B*, Nukleonika, 58, 2013, s. 401-405.
6. De la Rosa J.M., Martin-Sanchez P.M., Sanchez-Cortes S., Hermosin B., Knicker H., Saiz-Jimenez C., *Structure of melanins from the fungi Ochroconis lascauxensis and Ochroconis anomala contaminating rock art in the Lascaux Cave*, Scientific Reports, 7, 2017, s. 13441.
7. Gonçalves R.C.R., Lisboa H.C.F., Pombeiro-Sponchiado S.R., *Characterization of melanin pigment produced by Aspergillus nidulans*, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28, 2012, s. 1467-1474.
8. Hou R., Liu X., Yan J., Xiang K., Wu X., Lin W., Chen G., Zheng M., Fu J., *Characterization of natural melanin from Auricularia auricula and its hepatoprotective effect on acute alcohol liver injury in mice*, Food and Function, 10, 2019, s. 1017-1027.
9. Jalmi P., Bodke P., Wahidullah S., Raghukumar S., *The fungus Glioccephalotrichum simplex as a source of abundant, extracellular melanin for biotechnological applications*, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28, 2012, s. 505-512.
10. Manirethan V., Raval K., Balakrishnan R.M., *Adsorptive removal of trivalent and pentavalent arsenic from aqueous solutions using iron and copper impregnated melanin extracted from the marine bacterium Pseudomonas stutzeri*, Environmental Pollution, 257, 2020, s. 113576.
11. Bayram S., Dengiz C., Gerçek Y.C., Cetin I., Topcul M.R., *Bioproduction, structure elucidation and in vitro antiproliferative effect of eumelanin pigment from Streptomyces parvus BSB49*, Archives of Microbiology, 202, 2020, s. 2401-2409.
12. Ghadge V., Kumar P., Singh S., Mathew D.E., Bhattacharya S., Nimse S.B., Shinde P.B., *Natural melanin produced by the endophytic Bacillus subtilis 4NP-BL associated with the halophyte Salicornia brachiata*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 68, 2020, s. 6854-6863.
13. Drewnowska J.M., Zambrzycka M., Kalska-Szostko B., Fiedoruk K., Swiecicka I., *Melanin-like pigment synthesis by soil Bacillus weihenstephanensis isolates from northeastern Poland*, PLoS One, 10, 2015.
14. Maher S., Mahmoud M., Rizk M., Kalil H., *Synthetic melanin nanoparticles as peroxynitrite scavengers, photothermal anticancer and heavy metals removal platforms*, Environmental Science and Pollution Research International, 27, 2020, s. 19115-19126.
15. Gibka J., *Wykorzystanie melaniny i procesu melanogenezy w kosmetykach*, Polish Journal of Cosmetology, 3, 2000, s. 164-176.
16. Battistella C., McCallum N.C., Gnanasekaran K., Zhou X., Caponetti V., Montalti M., Gianneschi N., *Mimicking natural human hair pigmentation with synthetic melanin*, ACS Central Science, 6, 2020, s. 1179-1188.



17. Magarelli M., Passamonti P., Renieri C., *Purification, characterization and analysis of sepia melanin from commercial sepia ink (Sepia officinalis)*, Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia, 5, 2010, s. 18-28.
18. Rok J., Otręba M., Buszman E., Wrześniok D., *Melanina – z melanocyту do keratynocyту, czyli jak przebiega transport melaniny w skórze*, Annales Academiae Medicae Silesiensis, 66, 2012, s. 60-66.
19. Maranduca M.A., Branisteanu D., Serban D.N., Branisteanu D.C., Stoleriu G., Manolache N., Serban I.L., *Synthesis and physiological implications of melanic pigments*, Oncology Letters, 17, 2009, s. 4183-4187.
20. Zdybel M., Pilawa B., Buszman E., Wrześniok D., *Zastosowanie spektroskopii EPR do badania melanin oraz kompleksów melanin z jonami metali i substancjami leczniczymi*, Farmaceutyczny Przegląd Naukowy, 6, 2009, s. 42-46.
21. Beberok A., Zdybel M., Pilawa B., Buszman E., Wrześniok D., *EPR characteristics of free radicals in DOPA-melanin-moxifloxacin complexes at ambient level of UVA radiation*, Chemical Physics Letters, 592, 2014, s. 41-46.
22. Delijewski M., Buszman E., Wrześniok D., *Oddziaływanie nikotyny z melaniną*, Annales Academiae Medicae Silesiensis, 67, 2013, s. 361-366.
23. Thompson A.M., *Ocular toxicity of fluoroquinolones*, Clinical and Experimental Ophthalmology, 35, 2007, s. 566-577.
24. Beberok A., Buszman E., Zdybel M., Pilawa B., Wrześniok D., *EPR examination of free radical properties of DOPA-melanin complexes with ciprofloxacin, lomefloxacin, norfloxacin and sparfloxacin*, Chemical Physics Letters, 497, 2010, s. 115-122.
25. Otręba M., Zdybel M., Pilawa B., Beberok A., Wrześniok D., Rok J., Buszman E., *EPR spectroscopy of chlorpromazine-induced free radical formation in normal human melanocytes*, European Biophysics Journal, 44, 2015, s. 359-365.
26. Sarna T., *Badanie struktury i właściwości centrów aktywnych melanin*, Zagadnienia Biofizyki Współczesnej, 6, 1981, s. 201-219.
27. Meredith P., Sarna T., *The physical and chemical properties of eumelanin*, Pigment Cell & Melanoma Research, 19, 2006, s. 572-594.
28. Wrześniok D., Rok J., Beberok A., Rzepka Z., Respondek M., Pilawa B., Zdybel M., Delijewski M., Buszman E., *Kanamycin induces free radicals formation in melanocytes: An important factor for aminoglycosides ototoxicity*, Journal of Cellular Biochemistry, 120, 2019, s. 1165-1173.
29. Godechal Q., Gallez B., *The contribution of electron paramagnetic resonance to melanoma research*, Journal of Skin Cancer, 2011, 2011, s. 273280.
30. Zdybel M., Chodurek E., Pilawa B., *Application of EPR spectroscopy to determine the influence of simvastatin concentration on free radicals in A-375 human melanoma malignant cells*, Toxicology in Vitro, 61, 2019, s. 104620.
31. Orlicki A., *Zastosowanie spektroskopii EPR do badania wpływu wybranych czynników fizycznych na wolne rodniki melaniny* (praca magisterska), Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Sosnowiec 2021.
32. Ramos P., Pilawa B., *Zastosowanie spektroskopii EPR do optymalizacji procesów sterylizacji termicznej w farmacji i medycynie*, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Katowice 2018.
33. Weil J.A., Bolton J.R., *Electron paramagnetic resonance: elementary theory and practical applications, Second Edition*, John Wiley & Sons, New York 2007.
34. Eaton G.R., Eaton S.S., Salikhov K.M., *Foundations of modern EPR*, World Scientific, Singapore 1998.
35. Stankowski J., Hilczer W., *Wstęp do spektroskopii rezonansów magnetycznych*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005.
36. Zdybel M., Pilawa B., Buszman E., Wrześniok D., *Effect of oxygen on free radicals in DOPA-melanin complexes with netilmicin, diamagnetic Zn(II) and paramagnetic Cu(II)*, Chemical Physics Letters, 556, 2013, s. 278-286.

37. Wiernek B.K., Pilawa B., Zdybel M., Buszman E., Wrześniok D., *Interaction of free radicals of DOPA-melanin-streptomycin complexes with paramagnetic oxygen O<sub>2</sub>*, Journal of Applied Biomedicine, 12, 2014, s. 161-169.
38. Zdybel M., Chodurek E., Pilawa B., *Free radicals in ultraviolet irradiated melanins and melanin complexes with Cd(II) and Cu(II) – EPR examination*, Journal of Applied Biomedicine, 13, 2015, s. 131-141.
39. Zdybel M., Pilawa B., Chodurek E., *Effect of cadmium(II) on free radicals in DOPA-melanin tested by EPR spectroscopy*, Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research, 72, 2015, s. 901-907.
40. Chodurek E., Zdybel M., Pilawa B., *Application of EPR spectroscopy to examination of free radicals in melanins from A-375 and G-361 human melanoma malignum cells*, Journal of Applied Biomedicine, 11, 2013, s. 173-185.
41. Chodurek E., Zdybel M., Pilawa B., Dzierzewicz Z., *Examination by EPR spectroscopy of free radicals in melanins isolated from A-375 cells exposed on valproic acid and cisplatin*, Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research, 69, 2012, s. 1334-1341.
42. Buszman E., Pilawa B., Zdybel M., Wilczyński S., Gondzik A., Witoszyńska T., Wilczok T., *EPR examination of Zn<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> binding by pigmented soil fungi Cladosporium cladosporioides*, Science of the Total Environment, 363, 2006, s. 195-205.
43. Chodurek E., Kurkiewicz S., Turek A., Marcinkowski A., Trzebicka B., Dzierżęga-Lęcznar A., Stępień K., Dzierzewicz Z., *Technika pirolizy i mikroskopii sił atomowych w badaniu struktury syntetycznej melaniny z tyrozyny i naturalnej melaniny z Sepia officinalis*, Farmaceutyczny Przegląd Naukowy, 60, 2010, s. 46-52.
44. Chodurek E., Czyżyk D., Pilawa B., Wilczyński S., *Badania centrów paramagnetycznych melaniny z Sepia officinalis metodą EPR*, Engineering of Biomaterials, 12, 2009, s. 8-32.
45. Zdybel M., Pilawa B., *Effect of UV irradiation on free radicals in synthetic melanin and melanin biopolymer from Sepia officinalis – EPR examination*, Nukleonika, 60, 2015, s. 483-488.
46. Dulliu O.G., *Electron paramagnetic resonance identification of irradiated cuttlefish (Sepia officinalis L.)*, Applied Radiation and Isotopes, 52, 2000, s. 1385-1390.
47. Buszman E., Pilawa B., Zdybel M., Wrześniok D., Grzegorzczak A., Wilczok T., *EPR examination of Zn<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> effect on free radicals in DOPA-melanin-netilmicin complexes*, Chemical Physics Letters, 403, 2005, s. 22-28.
48. Najder-Kozdrowska L., Pilawa B., Buszman E., Więckowski A.B., Świątkowska L., Wrześniok D., Wojtowicz W., *Triplet states in DOPA-melanin and in its complexes with kanamycin and copper Cu(II) ions*, Acta Physica Polonica A, 118, 2010, s. 613-618.
49. Pilawa B., Zdybel M., Chodurek E., *Application of electron paramagnetic resonance spectroscopy to examine free radicals in melanin polymers and the human melanoma malignum cells*, [w:] Blumenberg M. (red.), *Melanin*, InTech, Rijeka 2017.
50. Zdybel M., Chodurek E., Pilawa B., *Effect of simvastatin in different concentrations on free radicals in A-2058 human melanoma malignum cells – EPR studies*, Journal of Cellular Biochemistry, 120, 2019, s. 2483-2492.
51. Zdybel M., Chodurek E., Pilawa B., *EPR studies of free radicals in A-2058 human melanoma cells treated by valproic acid and 5,7-dimethoxycoumarin*, Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research, 71, 2014, s. 1066-1072.
52. Zdybel M., Pilawa B., Drewnowska J.M., Święcicka I., *Comparative EPR studies of free radicals in melanin synthesized by Bacillus weihenstephanensis soil strains*, Chemical Physics Letters, 679, 2017, s. 185-192.
53. Pilawa B., Zdybel M., Latocha M., Krzyminiewski R., Kruczyński Z., *Analysis of lineshape of black Drosophila melanogaster EPR spectra*, Current Topics in Biophysics, 31, 2008, s. 5-9.

## **Wpływ temperatury na wolne rodniki biopolimeru melaninowego z *Sepia officinalis***

### Streszczenie

Melaniny to pigmenty powszechnie występujące w przyrodzie, zawierające w warunkach naturalnych trwałe centra paramagnetyczne. Czynniki fizyczne, oddziałując na biopolimer melaninowy mogą wpływać na właściwości i koncentrację wolnych rodników, przez co biologiczne funkcje melaniny mogą ulec zmianie. Celem pracy było zbadanie wpływu temperatury na wolne rodniki modelowej melaniny z *Sepia officinalis*. Do badania wykorzystano spektrometr elektronowego rezonansu paramagnetycznego na pasmo X o częstotliwości 9,3 GHz oraz współpracujący z nim system numerycznej akwizycji danych Rapid Scan Unit. Wyznaczono wpływ temperatury 40°C i 50°C na właściwości paramagnetyczne melaniny z *Sepia officinalis*. Widma EPR wolnych rodników melaniny rejestrowano w szerokim zakresie mocy mikrofalowych wynoszącym 2,2-70 mW. Analiza widm badanych próbek melaninowych wykazała obecność pojedynczej, asymetrycznej linii EPR typowej dla eumelaniny. W melaninie z *Sepia officinalis* poddanej działaniu temperatury występują o-semichinonowe wolne rodniki o charakterystycznych wartościach współczynnika rozszczepienia spektroskopowego *g*. Centra paramagnetyczne w próbkach rozmieszczone są jednorodnie. Zarejestrowane szerokie linie EPR wskazują na silne oddziaływanie dipolowe i niewielkie odległości pomiędzy wolnymi rodnikami. Pod wpływem działania podwyższonej temperatury właściwości paramagnetyczne melaniny z *Sepia officinalis* uległy zmianie. Przeprowadzone badania potwierdziły skuteczność spektroskopii EPR w badaniach wpływu temperatury na wolne rodniki melaniny.

Słowa kluczowe: melanina, *Sepia officinalis*, temperatura, wolne rodniki, spektroskopia EPR

## **Effect of temperature on free radicals of melanin biopolymer from *Sepia officinalis***

### Abstract

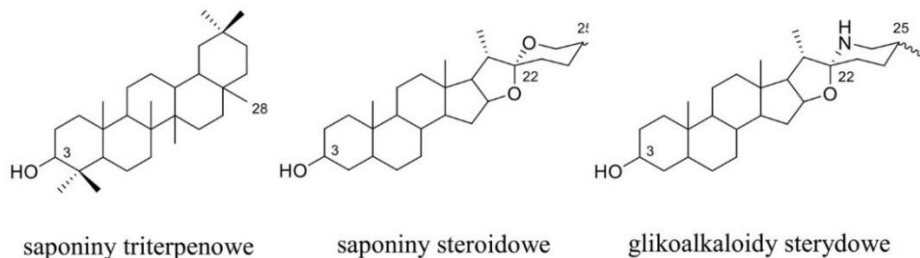
Melanins are pigments commonly found in nature that contain paramagnetic centers. Physical factors through their influence on the properties and concentration of free radicals of the biopolymer can modify the biological functions of melanin. The aim of the study was to investigate the effect of temperature on free radicals in model melanin from *Sepia officinalis*. The research used an X-band electron paramagnetic resonance spectrometer with a frequency of 9.3 GHz and the data acquisition system Rapid Scan Unit cooperating with it. The influence of the temperature of 40°C and 50°C on the paramagnetic properties of melanin from *Sepia officinalis* was determined. The EPR spectra of free radicals in melanin were recorded with microwave power in the range of 2.2-70 mW. The analysis of the spectra of the tested melanin samples showed the presence of single, asymmetric EPR line typical of eumelanin. o-Semiquinone free radicals with characteristic *g*-factors were present in melanin from *Sepia officinalis* treated with temperature. The paramagnetic centers in the samples were homogeneously distributed. The recorded wide EPR lines indicate strong dipolar interactions and small distances between free radicals. Under the influence of the increased temperature, the paramagnetic properties of melanin from *Sepia officinalis* have changed. The conducted studies confirmed the effectiveness of EPR spectroscopy in the study of the effect of temperature on free radicals in melanin.

Keywords: melanin, *Sepia officinalis*, temperature, free radicals, EPR spectroscopy

## Metody badań struktury saponin triterpenowych

### 1. Wstęp

Saponiny to grupa związków chemicznych szeroko rozpowszechnionych w naturze, zaliczanych do glikozydów. Ze względu na tę przynależność biochemiczną nazywane są również saponozydami. Występują głównie, ale nie wyłącznie, w królestwie roślin (ponad 500 gatunków). Nazwą „saponiny” określamy grupę substancji zbudowanych z lipofilowej części aglikonu (sapogeniny) oraz hydrofilowego glikonu, czyli części cukrowej, połączonych wiązaniem eterowym lub estrowym. Ze względu na rodzaj części niecukrowej (geniny/sapogeniny) związki te podzielono na trzy grupy: saponiny triterpenowe, czyli pochodne triterpenów właściwych, saponiny steroidowe o aglikonie steroidowym oraz glikoalkaloidy sterydowe, których sapogenina zawiera atom azotu związany w pierścieniu heterocyklicznym (rys. 1) [1].



Rysunek 1. Struktury aglikonów saponin [opracowanie własne]

Aglikon saponozydów triterpenowych zawiera 30 atomów węgla, najczęściej o strukturze pentacyklicznej – typu oleananu i ursanu lub o strukturze tetracyklicznej – typu dammaranu oraz lanostanu. Ten rodzaj saponin występuje najczęściej u przedstawicieli klasy roślin dwuliściennych. Z kolei w przypadku saponin steroidowych, występujących głównie u roślin jednoliściennych, sapogenina to układ sterolowy składający się z 27 atomów węgla o konformacji sześciopierścieniowego spirostanu, bądź – rzadziej – pentacyklicznego furostanu.

Aglikon saponin może być przyłączony do jednego, dwóch, a czasem także trzech łańcuchów cukrowych, co stanowi podstawę klasyfikacji tych substancji na mono-, bi- oraz tridesmozydy. Łańcuch cukrowy monodesmozydów związany jest najczęściej z grupą hydroksylową w pozycji C-3 aglikonu. W bidesmozydach jeden łańcuch cukrowy połączony jest poprzez wiązanie eterowe z węglem C-3, natomiast drugi poprzez wiązanie estrowe z atomem C-28 lub poprzez wiązanie eterowe z atomem C-26. Trzeci łańcuch cukrowy, obecny w tridesmozydach, spotykany jest w wielu różnych pozy-

<sup>1</sup> ula\_klimczak@poczta.onet.pl, Zakład Biochemii Roślin, Instytut Biochemii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, www.biol.uw.edu.pl/pl/.

<sup>2</sup> a.mroczek10@uw.edu.pl, Zakład Biochemii Roślin, Instytut Biochemii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, www.biol.uw.edu.pl/pl/.

cjach. Łańcuch cukrowy saponin może być prosty lub rozgałęziony, przy czym liczba reszt cukrowych wchodzących w jego skład wynosi zazwyczaj od dwóch do pięciu. Do cukrów prostych spotykanych najczęściej w omawianej klasie fitozwiązków należą D-glukoza, D-galaktoza, kwas D-glukuronowy, kwas D-galakuronowy, L-ramnoza, L-arabinoza, D-ksyloza i D-fukoza. Ponadto w saponinach dość często spotykane są aminocukry [2].

Poszczególne aglikony mogą różnić się rodzajem, liczbą i umiejscowieniem grup funkcyjnych, co skutkuje dużą naturalną różnorodnością saponin. Zwiększa się ona jeszcze bardziej, kiedy weźmiemy pod uwagę również skład, liczbę i rozgałęzienia łańcuchów cukrowych [1, 3-5]. Ta różnorodność determinuje różne właściwości biologiczne tych związków. W literaturze można znaleźć wiele doniesień o ich działaniu przeciwzapalnym, przeciwgrzybicznym, przeciwwirusowym, cytotoksycznym czy antyseptycznym [6]. Saponiny występują często w roślinach leczniczych i jadalnych, decydując o ich właściwościach farmaceutycznych i nutraceutycznych.

Stosowane od wieków na różnych kontynentach rośliny lecznicze oraz jadalne są obecnie intensywnie badane pod kątem zawartości substancji odpowiedzialnych za ich właściwości farmakologiczne. Okazuje się, że takimi związkami są m.in. saponiny. Dzięki postępowi technicznemu i angażowaniu coraz nowszych metod analitycznych liczba przebadanych gatunków roślin pod względem zawartości tych związków wciąż rośnie [7], jednak charakterystyka struktury, występowania, zawartości i właściwości biologicznych pochodnych kwasów triterpenowych w wielu roślinach wciąż jest niepełna, a przecież ich charakterystyka stanowi często podstawę do określenia zależności pomiędzy strukturą związku a jego funkcją oraz może być podstawą konstruowania nowych leków pochodzenia naturalnego.

Dlatego też dobranie odpowiednich metod badań nad strukturą saponin wydaje się niezwykle ważne. Aby zidentyfikować i scharakteryzować związki wyizolowane z surowca roślinnego wykorzystuje się obecnie przede wszystkim metody spektroskopowe, takie jak magnetyczny rezonans jądrowy (NMR), spektroskopia w podczerwieni (IR), spektrometria mas (MS) czy krystalografia rentgenowska [8]. Zastosowanie wymienionych technik w analizie saponin omówiono w poniższym podrozdziale na przykładzie wybranych prac badawczych. Po wpisaniu w wyszukiwarkę serwisu PubMed frazy „saponins NMR” otrzymujemy ponad 1,6 tys. wyników, zaś zapytanie „saponins MS” odsyła do prawie 3 tys. publikacji. Celem niniejszego opracowania jest przedstawienie części tych badań. Nie jesteśmy w stanie zaprezentować wszystkich osiągnięć naukowych z ostatnich lat w tej dziedzinie z ostatnich lat, dlatego skupimy się na najbardziej reprezentatywnych pracach, ukazujących pewne kierunki i schematy działania.

## **2. Metody badania struktury saponin triterpenowych**

### **2.1. Jądrowy rezonans magnetyczny (NMR)**

Od późnych lat 70., czyli od czasu, kiedy spektrometry z transformatą Fouriera weszły do powszechnego użycia, spektroskopia NMR stanowi podstawowe narzędzie ustalania struktury saponin. Ze względu na złożoną budowę tych substancji, w ich badaniach wykorzystuje się zazwyczaj eksperymenty zarówno jedno-, jak i wielowymiarowe. Informacje odczytywane z widm 1D  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR najczęściej nie wystarczają, aby ustalić strukturę wydzielonej saponiny i dlatego też konieczne jest przeprowadzenie eksperymentów wielowymiarowych, takich jak COSY, INADEQUATE, HMBC i HSQC.

## 2.1.1. Metody jednowymiarowe

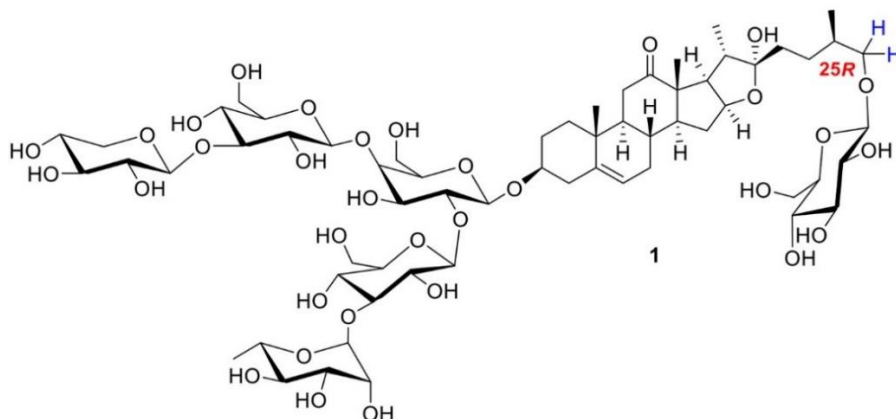
### 2.1.1.1. $^1\text{H}$ NMR

Występowanie wielu podobnych elementów budowy w cząsteczkach saponin powoduje, że jednowymiarowe widma  $^1\text{H}$  NMR tych substancji są mało czytelne, a liczne sygnały nakładają się. Ostatni z tych problemów dotyczy w szczególności pików pochodzących od protonów reszt cukrowych. Większość tych sygnałów pojawia się w stosunkowo wąskim zakresie przesunięć chemicznych (od 3,0 ppm do 4,2 ppm), co sprawia, że zazwyczaj tworzą jeden szeroki i niemożliwy do interpretacji multiplet [9].

Dość łatwo można natomiast rozpoznać piki odpowiadające protonom anomerycznym. Sygnały te położone są w charakterystycznym rejonie od 4,3 ppm do 5,5 ppm, a co najważniejsze – w zakresie tym nie ma najczęściej sygnałów pochodzących od innych ugrupowań. Znajomość omawianych pików pozwala ustalić takie cechy budowy saponiny jak liczba reszt cukrowych (na podstawie liczby sygnałów) czy konfiguracja anomerycznego atomu węgla (na podstawie wartości wicynalnej stałej sprzężenia pomiędzy protonami H-1 i H-2) [2].

W widmach  $^1\text{H}$  NMR saponin można także łatwo zidentyfikować sygnały pochodzące od angulanych grup metylowych – sapogeniny. Piki te uważane są za diagnostyczne dla poszczególnych typów szkieletu węglowego i co ważne – dla wielu związków zostały stabelizowane. Porównując więc dane eksperymentalne z danymi literaturowymi, można często zidentyfikować rodzaj aglikonu [2].

Omawiając zastosowanie widm protonowych w analizie saponin, warto także wspomnieć o empirycznych regułach ustalania konfiguracji absolutnej centrów stereogenicznych sapogeniny. Przykładem takiej metody może być ta umożliwiająca określenie orientacji 25R/25S grupy metylowej 27-Me w saponinach steroidowych typu furostanu – na podstawie różnicy przesunięć chemicznych protonów H2-26 ( $\Delta_{ab} = \delta_a - \delta_b$ ). Stwierdzono, że w szeregu 25R wartość  $\Delta_{ab}$  jest mniejsza lub równa 0,48 ppm, natomiast w przypadku związków o konfiguracji 25S – większa od 0,57 ppm [10]. Przedstawione podejście zostało wykorzystane m.in. w celu przypisania konfiguracji węgla C-25 w maglejozydzie I (związek **1**) wyizolowanym z liści *Agave offoyana* (Agavaceae). Obliczona dla tego związku różnica wartości przesunięć chemicznych H-26a (3,62 ppm) i H-26b (3,96 ppm) wyniosła 0,34 ppm, co wskazywało na konfigurację R (rys. 2) [11].



Rysunek 2. Struktura maglejozydu I [11]

### 2.1.1.2. $^{13}\text{C}$ NMR

W odróżnieniu od widm  $^1\text{H}$  NMR, odsprężone od protonów widma węglowe saponin są znacznie łatwiejsze w interpretacji – ze względu na to, że sygnały mają postać pojedynczych linii oraz pojawiają się w szerszym zakresie przesunięć chemicznych, piki są dobrze rozdzielone, a problem ich nakładania się praktycznie nie występuje. Wymienione właściwości oraz duża ilość informacji strukturalnych niesionych przez widma węglowe sprawiają, że pomiary te stanowią jedno z najcenniejszych narzędzi w analizie saponin [8, 12]. Eksperymenty 1D  $^{13}\text{C}$  NMR wykorzystuje się w celu ustalenia takich elementów budowy, jak: miejsce przyłączenia łańcucha cukrowego do aglikonu, rodzaj i liczba jednostek monosacharydowych, sekwencja łańcucha cukrowej oraz konfiguracja węgla anomerycznego.

W celu określenia miejsca przyłączenia łańcucha cukrowego do aglikonu porównuje się wartości przesunięć chemicznych w widmie węglowym badanej saponiny z odpowiednimi przesunięciami w widmie sapogeniny. Wykorzystuje się tu fakt, że modyfikacja grupy hydroksylowej aglikonu powoduje zmianę położenia sygnału zarówno węgla  $\alpha$ , jak i węgla  $\beta$  – sygnał  $\alpha$ -CH ulega przesunięciu w kierunku większych wartości  $\delta$ , natomiast sygnał  $\beta$ -CH – w kierunku wartości mniejszych. Przykładowo w większości monodesmozydów olenanenu przyłączenie cukru do grupy 3- $\beta$ -OH powoduje wzrost wartości przesunięcia chemicznego węgla C-3 o 8,0-11,5 ppm, natomiast zmiana wartości  $\delta$  atomów C-2 i C-4 mieści się w zakresie od  $\pm 0,9$  do  $-1,9$ . Ponadto przesunięciu ulegają sygnały C-23 (zmniejszenie wartości  $\delta$  o 0,5-5,1 ppm) i C24 ( $-0,2$ -1,6 ppm) [13].

Cukry proste wchodzące w skład saponin można łatwo rozróżnić na podstawie wartości przesunięć chemicznych w widmie węglowym, dzięki czemu pomiary  $^{13}\text{C}$  NMR pozwalają na ustalenie liczby oraz identyfikację jednostek monosacharydowych obecnych w badanym związku. O pierwszym z tych czynników świadczy liczba sygnałów odpowiadających węglom anomerycznym, natomiast rodzaj monosacharydu określa się poprzez porównanie zmierzonych  $\delta$  z odpowiednimi danymi literaturowymi. Dla przykładu w tabeli 1 przedstawiano przesunięcia chemiczne kilku cukrów prostych występujących powszechnie w saponinach [12].

Ponadto analiza widm węglowych pozwala na rozróżnienie cukrów występujących w formie furanozowej od ich izomerów o pierścieniu piranozowym – w porównaniu do odpowiednich sygnałów piranozydów, sygnały pochodzące od węgli C-1, C-2 i C-4 furanozydów są przesunięte o 4-14 ppm w kierunku większych wartości  $\delta$ , a sygnał C-5 o 4-7 ppm w kierunku wartości mniejszych (porównaj np. wiersze 1 i 3 w tabeli 1) [12].

Tabela 1. Przesunięcia chemiczne  $^{13}\text{C}$  dla wybranych metyloglikozydów (widma zarejestrowano w  $\text{D}_2\text{O}$ )

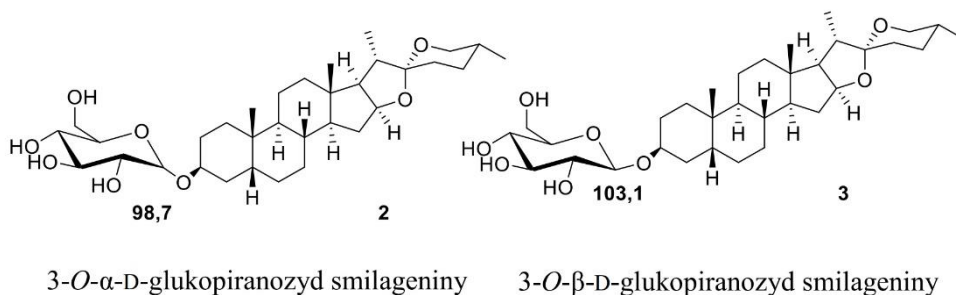
	glikozyd metylowy	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
1.	$\beta$ -D-glukopiranozyd	103,7	73,7	75,5	70,3	75,5	61,7
2.	$\alpha$ -D-glukopiranozyd	99,9	72,2	73,9	70,4	71,9	61,5
3.	$\beta$ -D-glukofuranozyd	110,0	80,6	75,8	82,3	70,7	64,7
4.	$\alpha$ -D-glukofuranozyd	104,7	-	-	80,4	-	62,6
5.	$\beta$ -D-galaktopiranozyd	104,1	71,2	73,3	69,1	75,3	61,4
6.	$\alpha$ -D-galaktopiranozyd	99,8	69,9	70,2	68,9	71,2	61,8
7.	$\beta$ -L-ramnopiranozyd	102,7	72,2	75,4	73,8	73,5	18,5
8.	$\alpha$ -L-ramnopiranozyd	102,4	71,9	72,5	73,6	69,4	18,4
9.	$\beta$ -D-arabinopiranozyd	100,7	69,8	69,8	69,1	63,4	
10	$\alpha$ -D-arabinopiranozyd	104,7	71,6	73,3	69,1	66,9	

Źródło: opracowanie własne na podstawie [11]

Kolejną informacją, którą można odczytać z widm  $^{13}\text{C}$  NMR, jest sposób powiązania jednostek monosacharydowych w łańcuchu cukrowym. Podobnie jak przy ustalaniu miejsca przyłączenia reszt cukrowych do aglikonu – korzysta się tutaj z faktu, że glikozylacja grupy hydroksylowej powoduje zmianę wartości  $\delta$  odpowiednich atomów  $\alpha\text{-C}$  oraz  $\beta\text{-C}$ . Stwierdzono, że w oligoglikozydach sygnał pierwszego z tych atomów przesuwają się o 4,2-8,5 ppm w kierunku większych wartości  $\delta$ , podczas gdy sygnał drugiego z nich o 0,5-2,0 ppm w kierunku wartości mniejszych. Omówione zmiany położenia sygnałów nie zależą od rodzaju monosacharydu [9, 12].

Ze względu na to, że wartości przesunięć chemicznych węgla anomerycznych zależą od konfiguracji tych atomów, analiza widma  $^{13}\text{C}$  NMR pozwala ustalić, czy dany cukier występuje w formie  $\alpha$ -, czy  $\beta$ -glikozydowej. Właściwość tę można zastosować na przykład w celu odróżnienia 3-O- $\alpha$ -D-glukopiranozydu smilageniny 2 od jego izomeru 3-O- $\beta$ -D-3 – w zarejestrowanym w pirydynie-d 5 w temperaturze 100 °C widmie  $^{13}\text{C}$  NMR pierwszej z tych substancji sygnał odpowiadający węglowi anomerycznemu znajduje się przy 98,7 ppm, natomiast w otrzymanym w tych samych warunkach widmie drugiej z nich – przy 103,1 ppm (rys. 3) [14].

Spektroskopia  $^{13}\text{C}$  NMR stosowana jest także w celu ustalenia budowy aglikonu. Identyfikacja ta oparta jest w znacznej mierze na porównaniu danych eksperymentalnych z tymi dostępnymi w literaturze [12].



Rysunek 3. Struktura pochodnych smilageniny [14]

## 2.1.2. Metody wielowymiarowe

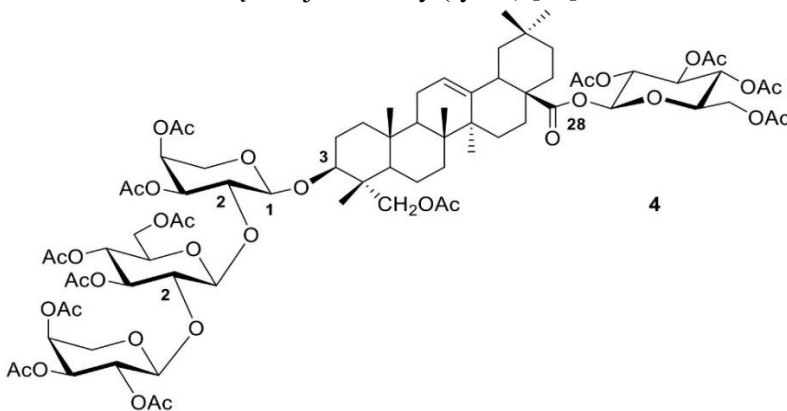
### 2.1.2.1. COSY (*Correlated spectroscopy*)

Pomiary COSY ułatwiają przypisanie sygnałów odpowiadającym im protonom oraz, co ważne, umożliwiają przeanalizowanie tych sygnałów, które w widmie jednowymiarowym nakładały się na siebie [10].

Ciekawym przykładem zastosowania eksperymentów COSY w badaniach saponin jest analiza medikozydu – związku 4 wydzielonego z korzeni lucerny (*Medicago sativa* L.; Fabaceae). Stwierdzono, że sygnały protonów cukrowych w widmie 1D  $^1\text{H}$  NMR acetylowej pochodnej tej substancji pojawiają się w zakresie szerszym niż 2,5 ppm. Jeżeli zastosowane pole było dostatecznie silne (>300 MHz), to sygnały te rozdzielały się na dwie strefy – pierwsza z nich, leżąca w zakresie 4,75-5,4 ppm, została przypisana grupom  $\text{CHOAc}$ , natomiast druga, znajdująca się pomiędzy 3,0 a 4,3 ppm – grupom  $\text{CH}_2\text{OAc}$ ,  $\text{CHOR}$  i  $\text{CH}_2\text{OR}$ . Protony anomeryczne monosacharydów związanych wiązaniem eterowym znajdowały się pomiędzy wspomnianymi strefami, a w przypadku



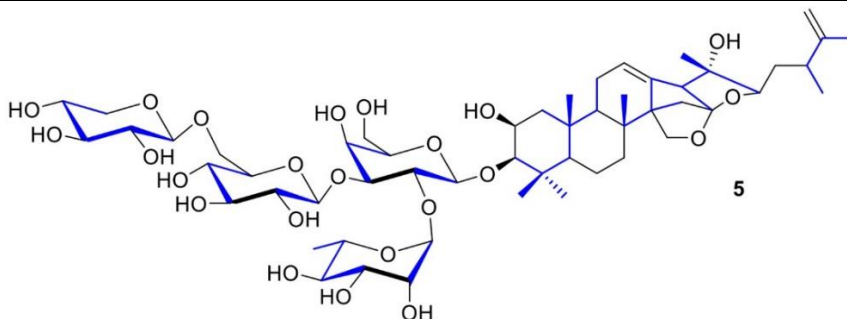
utworzenia wiązania estrowego – przy wartościach  $\delta$  powyżej 5,5 ppm. Na podstawie przeprowadzonego eksperymentu COSY ustalono, że badany związek zawiera terminalną resztę glukozy, terminalną resztę arabinozy oraz cząsteczki glukozy i arabinozy podstawione na atomie C-2. Ponieważ przesunięcie chemiczne węgla anomerycznego terminalnej glukozy odpowiadało utworzeniu wiązania estrowego, resztę tę można było umiejscowić przy grupie karboksylowej C-28 hederageniny. Informacje odczytane z obu widm, tj. 1D  $^1\text{H}$  NMR oraz 2D COSY, nie pozwoliły jednak na jednoznacznie określenie sekwencji łańcucha związanego z grupą hydroksylową przy atomie C-3 aglikonu *r* nie było pewne, czy badany związek ma wzór Ara(1→2)-Glu(1→2)-Ara(1→3)-hederagenina(28→1)-Glu, czy Ara(1→2)-Ara(1→2)-Glu(1→3)-hederagenina(28→1)-Glu. Powyższą wątpliwość udało się wyjaśnić przy pomocy pomiaru COSY dalekiego zasięgu (*long range* COSY). Eksperyment ten umożliwił bowiem zaobserwowanie sprzężenia  $^4J$  pomiędzy protonem anomerycznym wewnętrznej glukozy a atomem H-2 wewnętrznej arabinozy (rys. 4) [15].



Rysunek 4. Struktura medikozydu [15]

### 2.1.2.2. INADEQUATE (*Incredible Natural Abundance Double Quantum Transfer Experiment*)

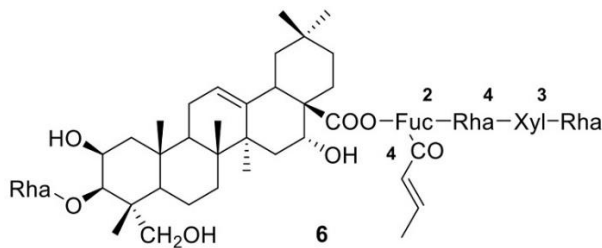
Ekspertymenty INADEQUATE dostarczają informacji o oddziaływaniach  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  i dzięki temu umożliwiają ustalenie budowy szkieletu węglowego cząsteczki. Pomiaru te charakteryzują się jednak niską czułością, co znacznie ogranicza ich stosowalność w badaniach metabolitów wtórnych, w tym saponin [16]. Jednym ze stosunkowo nielicznych przykładów wykorzystania eksperymentów INADEQUATE w analizie tej grupy glikozydów jest praca opublikowana przez Perera i współpracowników, opisująca próby ustalenia budowy związku wyizolowanego z *Alphitonia zizyphoides* (*Rhamnaceae*). Po specjalnej obróbce komputerowej widma, koniecznej ze względu na niską intensywność sygnałów, autorom udało się jednoznacznie zidentyfikować 35 z 53 możliwych wiązań węgiel-węgiel. Wiedza ta, wraz z informacjami uzyskanymi z widm jednowymiarowych oraz z pomiarów COSY, TOCSY, HETCOR, NOESY, ROESY, pozwoliła przypisać wydzielonej substancji wzór 5. Wiązania zidentyfikowane w oparciu o pomiar INADEQUATE zaznaczono kolorem niebieskim (rys. 5) [17].



Rysunek 5. Struktura saponiny wydzielonej z *Alphitonia zizyphoides* [17]

### 2.1.2.3. HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) oraz HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*)

Eksperymenty HSQC oraz HMBC pozwalają zidentyfikować atomy  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  oddalone od siebie odpowiednio o jedno wiązanie lub o większą liczbę wiązań [14]. Jednym z wielu przykładów wykorzystania tych pomiarów w badaniach saponin jest analiza bellissaponiny BA1 B (6) wyizolowanej ze stokrotki (*Bellis perennis*, *Asteraceae*). Dzięki zastosowaniu eksperymentów HSQC oraz HMBC można było w prosty sposób przypisać wszystkie sygnały widoczne w jednowymiarowych widmach  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR tego związku. Ponadto na podstawie korelacji dalekiego zasięgu udało się określić sekwencję łańcucha cukrowego oraz miejsca przyłączenia reszt cukrowych do aglikonu (rys. 6) [18].



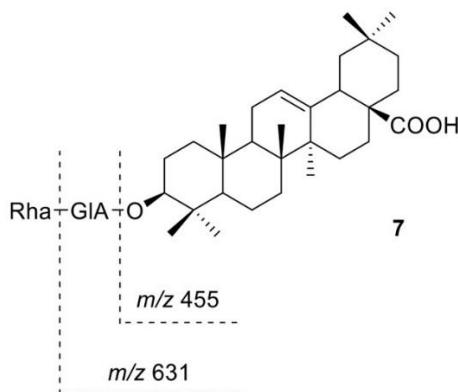
Rysunek 6. Struktura bellissaponiny BA1 [18]

## 2.2. Spektrometria mas (MS)

Spektrometria mas stanowi bardzo użyteczne narzędzie analizy saponin, ponieważ dostarcza informacje zarówno o masie, jak i o strukturze cząsteczki. Istotną kwestią w badaniach metodą MS jest wybór odpowiedniej techniki jonizacji. Decyzja ta zależy od czynników takich jak masa cząsteczkowa związku, jego lotność, stabilność termiczna, a także cel analizy [19].

Do lat 90. sposobem jonizacji stosowanym najpowszechniej w badaniach saponin był FAB (ang. *Fast Atom Bombardment*). Technika ta zaliczana jest do łagodnych metod jonizacji (tj. takich, które powodują jedynie nieznaczną fragmentację analitu), a polega na bombardowaniu próbki umieszczonej w specjalnej matrycy wiązką atomów o dużej energii [10].

Typowym przykładem zastosowania metody FAB-MS przy ustalaniu struktury saponin jest praca Borela i Hostemanna, w której opisano analizę monodesmozydu wyizolowanego z *Swartzia madagascariensis* (*Leguminosae*). W zarejestrowanym w trybie jonów ujemnych widmie tego związku zaobserwowano jon pseudomolekularny o  $m/z$  777  $[M - H]^-$  oraz sygnały jonów potomnych o  $m/z$  631  $[(M - H) - 146]^-$  i 455  $[(M - H) - 322]^-$ . Można więc było stwierdzić, że badana saponina ma masę cząsteczkową 778 Da, a jony potomne są skutkiem oderwania w kolejności cząsteczki ramnozy oraz cząsteczki kwasu uronowego. Informacje te w połączeniu z danymi z eksperymentów NMR pozwoliły przypisać analizowanej substancji strukturę **7** (rys. 7) [20].

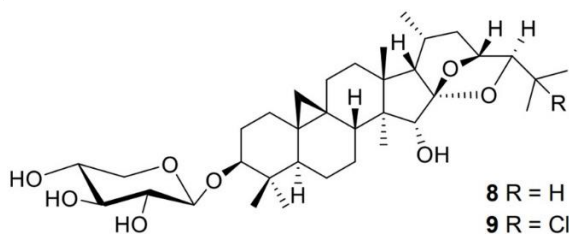


Rysunek 7. Struktura monodesmozydu wyizolowanego z *Swartzia madagascariensis* [20]

Obecnie metodą jonizacji wybieraną przez większość badaczy jest elektrosprej (ang. *Electrospray*, ESI). W technice tej roztwór analitu w odpowiednim lotnym rozpuszczalniku przepuszcza się przez cienką igłę, do której przyłożono bardzo wysokie napięcie. Powstające na wyjściu z kapilary naładowane krople tracą następnie stopniowo rozpuszczalnik, co powoduje wzrost gradientu potencjału przy ich powierzchni. Gdy ten przekroczy wartość krytyczną, dochodzi do tzw. eksplozji kulombowskiej, w wyniku której jony uwalniane są do fazy gazowej. Popularność techniki ESI-MS wynika m.in. z szerokiego zakresu stosowalności, z możliwości uzyskania bardzo dobrego limitu detekcji oraz z łatwości sprzężenia z chromatografią cieczową (próbka jest już w roztworze).

Spośród licznych prac opisujących zastosowanie metody ESI-MS w badaniach saponin – warto przywołać tę opublikowaną w 2007 roku przez Chena i współpracowników. W trakcie opracowywania metody HPLC do standaryzacji ekstraktów z korzeni pluskwicy groniastej (*Cimicifuga racemosa* L.; *Ranunculaceae*), autorzy wydzielili substancję o  $t_r = 62$  min., której jednowymiarowe widma  $^1H$  i  $^{13}C$  NMR były nierozróżnialne od tych zarejestrowanych dla cimicifugozydu (ksylozydu 3-O- $\alpha$ -D-cimigenolu) – **8**. Pik chromatograficzny przypisany saponinie **8** znajdował się jednak przy znacznie krótszym czasie retencji ( $t_r = 42$  min.). Zagadka ta skłoniła Chena i współpracowników do podjęcia szczegółowych badań mających na celu ustalenie struktury nowowydzielonego związku **9**. Jedne z najistotniejszych informacji o budowie tej substancji dostarczyła naukowcom spektrometria mas – w widmie HR-ESI-MS saponiny o  $t_r = 62$  min. widoczny był profil izotopowy charakterystyczny dla związku

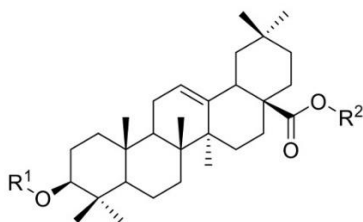
zawierającego w swojej strukturze atom chloru. Zaobserwowany jon pseudomolekularny  $[M+H]^+$  odpowiadał natomiast wzorowi sumarycznemu  $C_{35}H_{55}O_8Cl$ . Przeprowadzona następnie wnikliwa analiza widm  $^1H$  i  $^{13}C$  NMR oraz COSY, HSQC, HMBC i NOESY saponiny **9** doprowadziła do stwierdzenia, że jest ona analogiem cimicifugozydu posiadającym w pozycji C-25 atom chloru zamiast grupy hydroksylowej. Uzyskane przez autorów wyniki w pełni wyjaśniały tak duże podobieństwo widm  $^1H$  i  $^{13}C$  NMR substancji o  $t_r = 42$  min. i  $t_r = 62$  min. – niewielkie różnice przesunięć chemicznych zaobserwowano dopiero w widmach otrzymanych na aparacie 900 MHz. Ze względu na to, że związki halogenoorganiczne spotykane są w roślinach stosunkowo rzadko, grupa Chena postanowiła przeprowadzić dodatkowe eksperymenty w celu wyjaśnienia, czy związek **9** występuje naturalnie, czy jest to artefakt powstający w trakcie izolacji. Otrzymane przez autorów wyniki przemawiały na korzyść drugiej z wymienionych możliwości (rys. 8) [21].



Rysunek 8. Struktura saponiny z korzeni pluskwicy groniastej [21]

Znacznie więcej informacji o strukturze saponiny można otrzymać metodą tandemowej spektrometrii mas (MS/MS,  $MS^2$ ). Idea tej techniki polega na wyodrębnieniu z puli jonów fragmentacyjnych tzw. jonu-prekursora, poddaniu go fragmentacji i uzyskaniu widma jonów potomnych. Niektóre aparaty umożliwiają wykonanie pomiarów typu  $MS^n$ , czyli takich, w których przedstawiony cykl powtarza się kilkakrotnie. Należy dodać, że tandemowa spektrometria mas umożliwia analizę związków obecnych w mieszaninie [10].

Technika  $MS^n$  w połączeniu z HPLC została zastosowana między innymi przez Sun i współpracowników w celu charakteryzacji saponin obecnych w ekstraktach z 9 odmian powojnika (*Clematis* sp. L.; *Ranunculaceae*). Metodą jonizacji zastosowaną w tych badaniach był elektrosprej. W widmie MS jonów ujemnych, zarejestrowanym w trybie pełnego skanowania, autorzy zaobserwowali jony  $[M-H]^-$ ,  $[M+Cl]^-$ ,  $[M+HCOO]^-$  dla wszystkich związków. Spośród wymienionych indywidualów do dalszych eksperymentów MS wybrano  $[M-H]^-$ . Na podstawie otrzymanych widm  $MS^n$  ( $n = 2-4$ ) Sun i współpracownicy stwierdzili, że dwie spośród saponin obecnych w ekstraktach nie zostały dotychczas opisane. Co najważniejsze, uzyskane dane pozwoliły zidentyfikować te substancje jako: ester 28-O-ramnopiranozylo→glukopiranozylo→glukopiranozyłowy 3-O-rybo-piranozylo→ramnopiranozylo →(glukopiranozylo)→arabinopiranozylo hederageniny **10** oraz ester 28-O-ramnopiranozylo→glukopiranozylo→glukopiranozyłowy 3-O-glukopiranozylo→rybopiranozylo→ramnopiranozylo →arabinopiranozylo hederageniny **11** (rys. 9) [22].



- |    |                              |                                    |
|----|------------------------------|------------------------------------|
| 10 | R <sup>1</sup> = Rha-Glc-Glc | R <sup>2</sup> = Rib-Rha-(Glc)-Ara |
| 11 | R <sup>1</sup> = Rha-Glc-Glc | R <sup>2</sup> = Glc-Rib-Rha-Ara   |

Rysunek 9. Struktura saponin występujących w powojniku (*Clematis* L.) [22]

Metoda MS/MS jest ostatnio wykorzystywana jako alternatywa dla analiz NMR. Saponiny posiadają tak ogromną różnorodność budowy, że ich charakterystyka strukturalna przy użyciu metody NMR pozostaje bardzo trudna. Czasami spektrometria mas pozostaje jedyną dostępną metodą charakteryzowania związków naturalnych występujących w mieszaninie lub wzbogaconych ekstraktach. Oczywiście kilka aspektów wykorzystania metody MS/MS pozostaje problematycznych pomimo widocznych korzyści z charakteryzowania saponin za pomocą spektrometrii masowej. Jedno z wyzwań dotyczy ustalenia stereochemii różnych centrów stereogenicznych, w tym konfiguracji wiązań glikozydowych i rozróżniania między epimerycznymi cukrami. Dane te można uzyskać jedynie z zaawansowanej analizy spektroskopowej poszczególnych związków. Jednak izolacja i pełne wyjaśnienie strukturalne saponin w materiałach roślinnych są zadaniami szczególnie skomplikowanymi i czasochłonnymi ze względu na podobne właściwości chromatograficzne, izomeryzację, a także występowanie tych związków w materiale roślinnym w małych ilościach. Złożona struktura saponin o wyraźnie podobnych właściwościach chromatograficznych oraz obecność licznych izomerów to główne czynniki utrudniające izolację i pełną charakterystykę strukturalną saponin z kultywarów gatunku buraka zwyczajnego (*Beta vulgaris* L.; *Amaranthaceae*). Nie można wykluczyć, że w najbliższej przyszłości nie uda się oddzielić i poddać analizie NMR wykrytych i wstępnie zidentyfikowanych na podstawie analizy HPLC-ESI-MS/MS 44 saponin w korzeniach buraka ćwikłowego [23] oraz 21 saponin z liści buraka liściowego [24]. Tak więc, w przypadku tych roślin potrzebna jest czuła metoda taka jak LC-MS/MS. Dane MS/MS pozwalające na wstępną identyfikację struktury saponin buraka ćwikłowego i liściowego obecnie stanowią jedyny możliwy sposób badania właściwości strukturalnych tych bioaktywnych metabolitów. Jak pokazuje tabela 2 – ścieżki fragmentacji niektórych związków występujących w buraku ćwikłowym i liściowym odpowiadają strukturze betawulgarozydów z buraka cukrowego (rys. 10), których struktura została w pełni opisana na podstawie analiz NMR [25, 26]. Stanowi to podstawę do przyszłych badań, które są wymagane do wyjaśnienia dokładnej struktury poszczególnych saponin ze wszystkich kultywarów buraka.

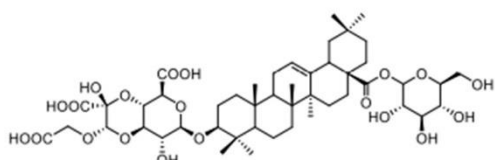
Tabela 1. Dane MS oraz identyfikacja saponin obecnych w buraku ćwikłowym (BC) i w buraku liściowym w porównaniu do struktur betawulgarozydów I-X z buraka cukrowego (BC). Hex – heksoza, hHex – uwodniona heksoza, Pen – pentoza, hPen – uwodniona pentoza, UrA – kwas uronowy, Act – podstawnik acetalowy, Diox – podstawnik typu dioksolanowy

Ścieżki fragmentacji jonu pseudomolekularnego do aglikonu za pomocą analiz HPLC-ESI-MS/MS	Prawdopodobna struktura saponiny	Występowanie	
		BC	BL
	Przyporządkowany betawulgarozyd z BC		
MS <sup>2</sup> [953,4388]: 909 [M-CO <sub>2</sub> -H] <sup>+</sup> , 793 [M-Diox-H] <sup>+</sup> , 631 [M-Diox-Hex-H] <sup>+</sup> MS <sup>3</sup> [953,4388 → 793]: 673 [M-Diox-C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> -H] <sup>+</sup> , 631 [M-Diox-Hex-H] <sup>+</sup> , 613 [M-Diox-hHex-H] <sup>+</sup> , 455 [M-Diox-Hex-UrA-H] <sup>+</sup>	Diox-Hex-UrA-kwas oleanolowy Betawulgarozyd I	+	-
MS <sup>2</sup> [791,3839]: 631 [M-Diox-H] <sup>+</sup> , 455 [M-Diox-UrA-H] <sup>+</sup>	Diox-UrA-kwas oleanolowy Betawulgarozyd II	+	+
MS <sup>2</sup> [955,4512]: 835 [M-C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sub>5</sub> -H] <sup>+</sup> , 793 [M-Act-H] <sup>+</sup> , 631 [M-Act-Hex-H] <sup>+</sup> , 455 [M-Act-Hex-UrA-H] <sup>+</sup>	Act-Hex-UrA-kwas oleanolowy Betawulgarozyd III	+	+
MS <sup>2</sup> [793,3996]: 673 [M-C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sub>5</sub> -H] <sup>+</sup> , 631 [M-C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sub>5</sub> -C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O-H] <sup>+</sup> , 455 [M-C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sub>5</sub> -C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O-UrA-H] <sup>+</sup>	Act-UrA-kwas oleanolowy Betawulgarozyd IV	+	+
MS <sup>2</sup> [1117,5017]: 835 [M-Act-C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> -H] <sup>+</sup> , 793 [M-Act-Hex-H] <sup>+</sup> , 731 [M-Act-hHex-CO <sub>2</sub> -H] <sup>+</sup> , 631 [M-Act-Hex-Hex-H] <sup>+</sup> , 455 [M-Act-Hex-Hex-UrA-H] <sup>+</sup>	Act-Hex-Hex-UrA-kwas oleanolowy Betawulgarozyd V	+	+
MS <sup>2</sup> [971,4493]: 851 [M-C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sub>5</sub> -H] <sup>+</sup> , 809 [M-Act-H] <sup>+</sup> MS <sup>3</sup> [971,4493 → 851]: 689 [M-C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sub>5</sub> -Hex-H] <sup>+</sup> , 645 [M-C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sub>5</sub> -Hex-CO <sub>2</sub> -H] <sup>+</sup> , 471 [M-C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sub>5</sub> -C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O-Hex-UrA-H] <sup>+</sup>	Act-Hex-UrA-hederagenina Betawulgarozyd VI	+	-
MS <sup>2</sup> [809,3945]: 689 [M-C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sub>5</sub> -H] <sup>+</sup> , 647 [M-C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sub>5</sub> -C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O-H] <sup>+</sup> , 471 [M-C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sub>5</sub> -C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O-UrA-H] <sup>+</sup>	Act-UrA-hederagenina Betawulgarozyd VII	+	+
MS <sup>2</sup> [939,4236]: 819 [M-C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sub>5</sub> -H] <sup>+</sup> , 777 [M-Act-H] <sup>+</sup> , 657 [M-C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sub>5</sub> -Hex-H] <sup>+</sup>	Act-Hex-UrA-kwas akebonowy Betawulgarozyd VIII	+	-
MS <sup>2</sup> [1087,4913]: 925 [M-Hex-H] <sup>+</sup> , 793 [M-Hex-Pen-H] <sup>+</sup> , 731 [M-Hex-CO <sub>2</sub> -hPen-H] <sup>+</sup> , 455 [M-Hex-Hex-Pen-UrA-H] <sup>+</sup>	Hex-Hex-Pen-UrA-kwas oleanolowy Betawulgarozyd IX	+	+
MS <sup>2</sup> [909,4491]: 789 [M-C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> -H] <sup>+</sup> , 747 [M-Hex-H] <sup>+</sup> , 685 [M-hHex-CO <sub>2</sub> -H] <sup>+</sup> , 597 [M-hHex-Pen-H] <sup>+</sup> , 553 [M-Hex-hPen-H <sub>2</sub> O-CO <sub>2</sub> -H] <sup>+</sup>	Hex-Pen-UrA-kwas akebonowy Betawulgarozyd X	+	-

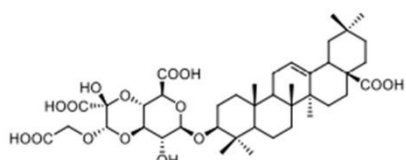
Źródło: opracowanie własne na podstawie [23-26]

### 2.3. Spektroskopia w podczerwieni (IR)

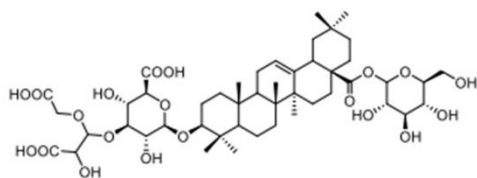
Podstawowym zastosowaniem spektroskopii w podczerwieni jest identyfikacja grup funkcyjnych obecnych w badanym związku. Przykładowo: w widmie IR indykacyny **12**, saponiny występującej w częściach naziemnych *Fagonia indica* Burm (*Zygo-phylaceae*), obecne są pasma przy liczbach falowych 3426 cm<sup>-1</sup>, 1730 cm<sup>-1</sup>, 1710 cm<sup>-1</sup>, 1658 cm<sup>-1</sup>, które wskazują na obecność odpowiednio grup hydroksylowych, grupy karbonylowej, grupy karboksylowej i wiązania podwójnego węgiel-węgiel (rys. 11) [27].



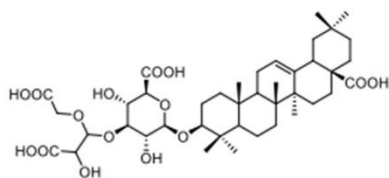
betawulgarozyd I (*m/z* 953)



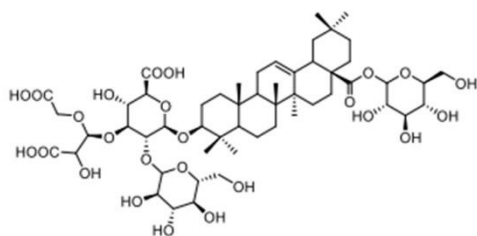
betawulgarozyd II (*m/z* 791)



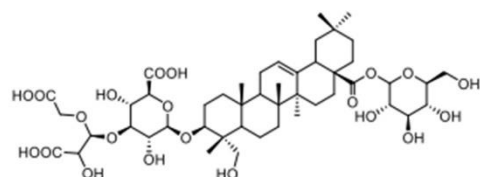
betawulgarozyd III (*m/z* 955)



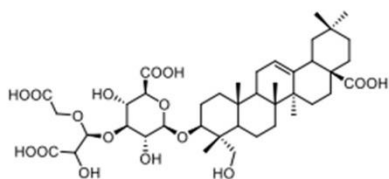
betawulgarozyd IV (*m/z* 793)



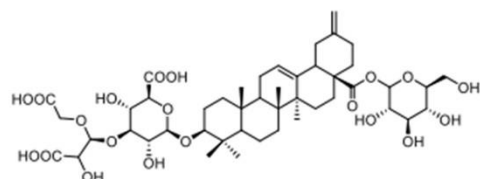
betawulgarozyd V (*m/z* 1117)



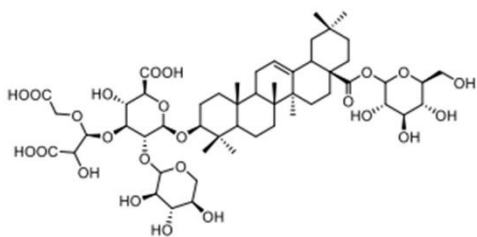
betawulgarozyd VI (*m/z* 971)



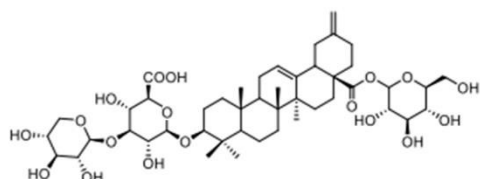
betawulgarozyd VII (*m/z* 809)



betawulgarozyd VIII (*m/z* 939)

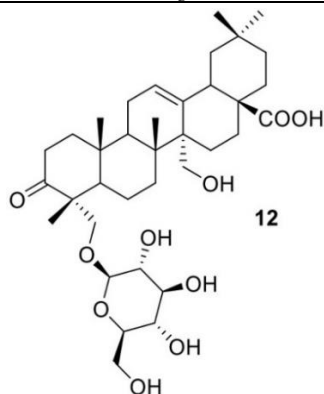


betawulgarozyd IX (*m/z* 1087)



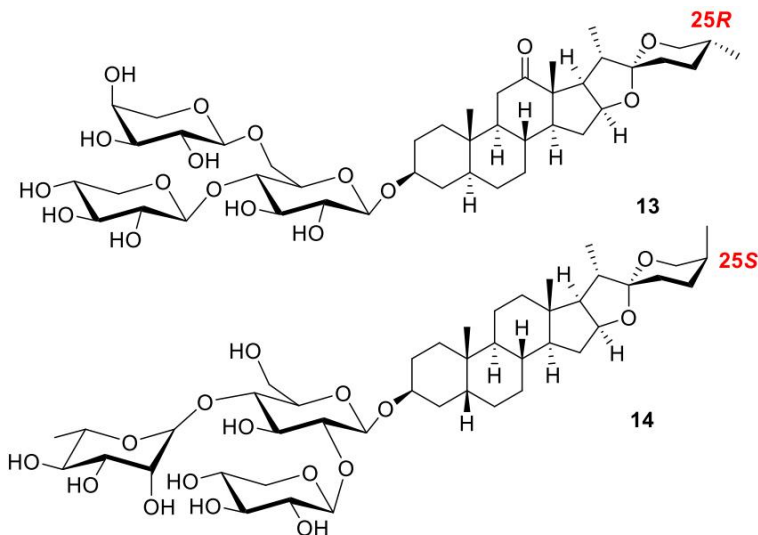
betawulgarozyd X (*m/z* 909)

Rysunek 10. Struktura betawulgarozydów I-X. Opracowanie własne na podstawie [25, 26]



Rysunek 11. Struktura indykacyny [27]

Analiza danych spektroskopowych saponin steroidowych typu spirostanu umożliwia ponadto ustalenie konfiguracji absolutnej atomu C-25. W tym celu porównuje się względne intensywności dwóch spośród czterech pasm charakterystycznych dla obecności w glikozydach (należących do tej klasy ugrupowania spiroketalowego) pasma położonego przy około  $920\text{ cm}^{-1}$  (pasmo B) oraz pasma znajdującego się przy  $900\text{ cm}^{-1}$  (pasmo C). Stwierdzono, że w przypadku związków będących przedstawicielami szeregu *25S* pasmo B charakteryzuje się większą intensywnością niż pasmo C, natomiast dla związków *25R* relacja ta jest odwrotna [28, 29]. Przedstawione zależności pozwoliły Zhou i współpracownikom przypisać atomowi węgla C-25 w filiasparozydzie A (13) konfigurację *R*, a odpowiadającemu centrum stereogenicznemu w filiasparozydzie C (14) – konfigurację *25R* (rys. 12). Obie substancje zostały wyizolowane przez autorów z korzeni *Asparagus filicinus* (*Liliaceae*) [30].

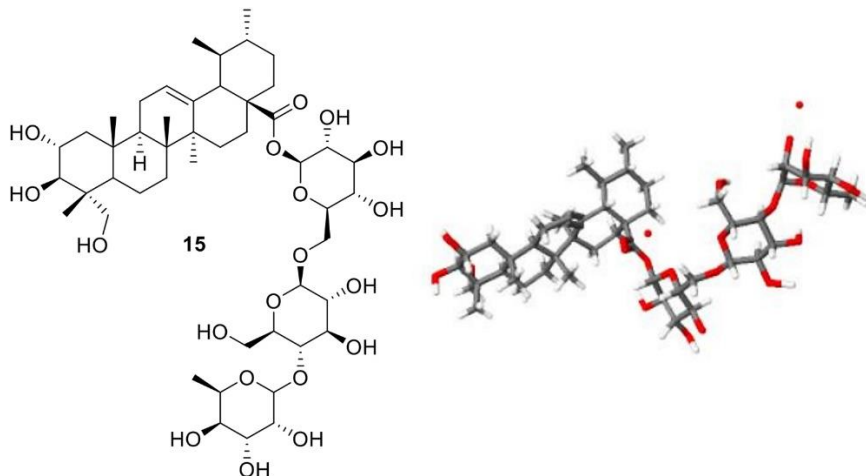


Rysunek 12. Struktury filiasparozydu A (13) oraz filiasparozydu C (14) [30]



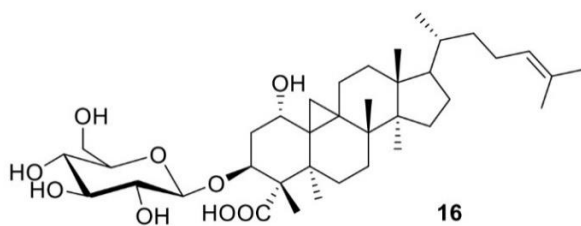
## 2.4. Krystalografia rentgenowska

Krystalografia rentgenowska jest techniką, która pozwala w sposób jednoznaczny określić strukturę badanego związku. Metoda ta znajduje jednak niewielkie zastosowanie w analizie saponin ze względu na trudność uzyskania odpowiednich kryształów. Wśród nielicznych substancji, dla których udało się z powodzeniem zastosować pomiary krystalograficzne, znajduje się między innymi azjatykozyd (15) wyizolowany z *Centella asiatica* (*Umbelliferae*). Przedstawia go rysunek 13. Monokryształ tej saponiny uzyskano w wyniku krystalizacji z dioksanu [31].



Rysunek 13. Wzór strukturalny azjatykozydu oraz struktura krystalograficzna tego związku [31]

Analiza krystalograficzna umożliwiła także potwierdzenie struktury 3- $\beta$ -D-glukozydu kwasu mollikowego 16 – związku wydzielonego po raz pierwszy z liści *Combretum molle* (*Combretaceae*). Strukturę obrazuje rysunek 14 [32].



Rysunek 14. Struktura 3- $\beta$ -D-glukozydu kwasu mollikowego [32]

## 3. Podsumowanie

Saponiny mogą być odpowiedzialne za wiele aktywności biologicznych roślin leczniczych i jadalnych. Różnice w strukturach poszczególnych związków mogą wpływać na obserwowane właściwości biologiczne roślin i otrzymywanych z nich ekstraktów, dlatego też analiza składu jakościowego saponin w tych roślinach jest jednym z głównych kierunków fitochemii. Ze względu na tak ogromną różnorodność struktur i trudności z otrzymaniem czystych związków – charakterystyka saponin przy użyciu zaawan-

sowanych technik NMR pozostaje bardzo trudna. Coraz częściej do analiz struktur saponin angażowane są metody spektrometrii masowej (MS), często połączone z chromatografią cieczową (LC), które pozwalają na wstępną identyfikację struktur tych związków w mieszaninie. Zastosowanie pozostałych opisanych w pracy metod jest raczej marginalne. Dzięki postępowi technicznemu i angażowaniu coraz to nowszych metod analitycznych liczba gatunków roślin przebadanych pod względem zawartości saponin wciąż rośnie. Ze względu na potencjalne wykorzystanie saponin jako leków pochodzenia naturalnego możemy spodziewać się intensywnego rozwoju opisanych metod zmierzających do połączenia precyzji analizy NMR oraz zalet analiz LC-MS – takich jak możliwość analizy związków bez ich wcześniejszego rozdzielania na pojedyncze związki chemiczne.

## Literatura

1. Sparg S.G., Light M.E., Van Staden J., *Biological activities and distribution of plant saponins*, J. Ethnopharmacol., 94, 2004, s. 219-243.
2. Hostettmann K., Marston A., *Saponins*, Cambridge University Press, Cambridge 1995, s. 3-18.
3. Oleszek W.A., *Chromatographic determination of plant saponins*, Journal of Chromatography A, 967, 2001, s. 147-162.
4. Parus A., *Właściwości farmakologiczne saponin*, Postępy Fitoterapii, 3, 2013, s. 200-204.
5. Sędek Ł., Michalik M., *Nowe badania nad saponinami ujawniają ich liczne lecznicze właściwości*, Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych, 54, 2005, s. 345-356.
6. Mroczek A., *Phytochemistry and bioactivity of triterpene saponins from Amaranthaceae family*, Phytochemistry Reviews, 14, 2015, s. 577-605.
7. Oleszek W., Biały Z., *Chromatographic determination of plant saponins. An update (2002-2005)*, Journal of Chromatography A, 1112, 2006, s. 78-91.
8. Mahato S.B., Garai S., *Triterpenoid saponins*, Progr. Chem. Org. Nat. Prod., 74, 1998, s. 191-196.
9. Agrawal P.K., *NMR Spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides*, Phytochemistry, 31, 1992, s. 3307-3330.
10. Silverstein R.M., Webster F.X., Kiemle D., *Spektroskopowe metody identyfikacji związków organicznych*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005, s. 512.
11. Pérez A.J., Simonet A.M., Calle J.M., Pecio L., Guerra J.O., Stochmal A., Macías F.A., *Phytotoxic steroidal saponins from Agave offoyana leaves*, Phytochemistry, 105, 2014, s. 92-100.
12. Agrawal P.K., Jain D.C., Gupta R.K., Thakur R.S., *Carbon-13 NMR spectroscopy of steroidal saponins and steroidal saponins*, Phytochemistry, 24, 1985, s. 2479-2496.
13. Agrawal P.K., *NMR Spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides*, Phytochemistry, 31, 1992, s. 3307-3330.
14. Seo S., Tomita Y., Tori K., Yoshimura Y., *Determination of the absolute configuration of a secondary hydroxy group in a chiral secondary alcohol using glycosidation shifts in carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy*, J. Am. Chem. Soc., 100, 1978, s. 3331-3339.
15. Massiot G., Lavaud C., Guillaume D., Le Men-Olivier L., Van Binst G., *Identification and sequencing of sugars in saponins using  $^2D^1H$  n.m.r. spectroscopy*, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 728, 1986, s. 1485-1487.
16. Williams A., Martin G., Rovnyak D., *Modern NMR approaches to the structure elucidation of natural products*, Royal Society of Chemistry, Cambridge 2014.
17. Perera P., Andersson R., Bohlin L., Andersson C., Li D., Owen N.L., Dunkel R., Mayne C.L., Pugmire R.J., Grant D.M., Cox P.A., *Structure determination of a new saponin from*

- the plant Alphonitonia zizyphoides* by NMR spectroscopy, Magn. Reson. Chem., 31, 1993, s. 472-480.
18. Schöpke T., Wray V., Rzazewska B., Hiller K., *Bellissaponins BA1 and BA2, acylated saponin from Bellis perennis*, Phytochemistry, 30, 1991, s. 627-631.
  19. Lee M.R., Chen C.M., Hwang B.H., Hsu L.M., *Analysis of saponins from black bean by electrospray ionization and fast atom bombardment tandem mass spectrometry*, J. Mass Spectrom., 34, 1999, s. 804-812.
  20. Borel C., Hostettmann K., *Molluscicidal saponins from Swartzia madagascariensis Desvaux*, Helv. Chim. Acta, 70, 1987, s. 570-576.
  21. Chen S.N., Lankin D.C., Nikolic D., Fabricant D.S., Lu Z.Z., Ramirez B., Van Breemen R.B., Fong H.H.S., Farnsworth N.R., Pauli G.F., *Chlorination diversifies Cimicifuga racemosa triterpene glycosides*, J Nat Prod, 70, 2007, s. 1016-1023.
  22. Sun F., He Q., Shi P., Xiao P., Cheng Y., *Characterization and identification of triterpenoid saponins in crude extracts from Clematis spp. by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization with multi-stage tandem mass spectrometry*, Rapid Commun. Mass Spectrom., 21, 2007, s. 3743-3750.
  23. Mikołajczyk-Bator K., Błaszczuk A., Czyżniejewski M., Kachlicki P., *Characterization and identification of triterpene saponins in the roots of red beet (Beta vulgaris L.) using two HPLC-MS systems*, Food Chemistry, 192, 2016, s. 979-990.
  24. Mroczek A., Klimczak U., Kowalczyk M., *Determination of saponins in leaves of four Swiss chard (Beta vulgaris L.) cultivars by UHPLC-CAD/QTOF-MS/MS*, Polish J. Food Nutr. Sci., 71, 2021, s. 147-159.
  25. Yoshikawa M., Murakami T., Kadoya M., Yamahara J., Matsuda H., *Medical foodstuffs. III. Sugar beet. (1): hypoglycemic oleanolic acid oligoglycosides, betavulgarosides I, II, III, and IV, from the root of Beta vulgaris L. (Chenopodiaceae)*, Chem. Pharm. Bull., 44, 1996, s. 1212-1217.
  26. Yoshikawa M., Murakami T., Kadoya M., Yamahara J., Matsuda H., *Medical foodstuffs. XV. Sugar beet. (2): structures of betavulgarosides V, VI, VII, VIII, IX and X from the roots and leaves of sugar beet (Beta vulgaris L., Chenopodiaceae)*, Chem. Pharm. Bull. 46, 1998, s. 1758-1763.
  27. Farheen R., Siddiqui B.S., Mahmood I., Simjee S.U., Majeed S., *Triterpenoids and triterpenoid saponins from the aerial parts of Fagonia indica Burm*, Phytochem. Lett., 13, 2015, s. 256-261.
  28. Eddy C.R., Wall M.E., Scott M.K., *Catalog of infrared absorption spectra of steroidal sapogenin acetates*, Analytical Chemistry, 25, 1953, s. 266-271.  
<https://doi.org/10.1021/ac60074a016>.
  29. Jones R.N., Katzenellenbogen E., Dobriner K., *The infrared absorption spectra of the steroid sapogenins*, J. Am. Chem. Soc., 75, 1953, s. 158-166.
  30. Zhou L.B., Chen T.H., Bastow K.F., Shibano M., Lee K.H., Chen D.F., *Iliasparosides A-D, cytotoxic steroidal saponins from the roots of Asparagus filicinus*, J. Nat. Prod., 70, 2007, s. 1263-1267.
  31. Mahato S.B., Sahu N.P., Luger P., Müller E., *Stereochemistry of a triterpenoid trisaccharide from Centella asiatica. X-Ray determination of the structure of asiaticoside*, J Chem. Soc., Perkin Trans. 2, 1987, s. 1509-1515.
  32. Pegel K.H., Rogers C.B., *The characterisation of mollic acid 3β-D-xyloside and its genuine aglycone mollic acid, two novel 1α-hydroxycycloartenoids from Combretum mole*, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 1985, s. 1711-1715.

## Metody badań struktury saponin triterpenowych

### Streszczenie

Nazwą „saponiny” określamy grupę substancji zbudowanych z lipofilowej części aglikonu – saponogenu oraz hydrofilowego glikonu, czyli części cukrowej. Poszczególne saponiny różnią się rodzajem aglikonów oraz składem, liczbą i wzorami rozgałęzień łańcuchów cukrowych, co skutkuje dużą naturalną różnorodnością saponin. Ta różnorodność determinuje różne właściwości biologiczne tych związków. W literaturze można znaleźć wiele doniesień o ich działaniu przeciwzapalnym, przeciwwgrzybiczym, przeciwwirusowym, cytotoksycznym czy antyseptycznym. Saponiny występują często w roślinach leczniczych i jadalnych, decydując o ich właściwościach farmaceutycznych i nutraceutycznych. Dzięki postępowi technicznemu i angażowaniu coraz to nowych metod analitycznych liczba przebadanych gatunków roślin pod względem zawartości tych związków wciąż rośnie, jednak charakterystyka struktury saponin w wielu roślinach wciąż jest niepełna. Dlatego też dobranie odpowiednich metod badań nad strukturą saponin wydaje się niezwykle ważne w kontekście określenia zależności między strukturą a funkcją oraz projektowania leków pochodzenia naturalnego. Aby zidentyfikować i scharakteryzować związki wyizolowane z surowca roślinnego wykorzystuje się obecnie przede wszystkim metody spektroskopowe, takie jak magnetyczny rezonans jądrowy (NMR), spektroskopia w podczerwieni (IR), spektrometria mas (MS), czy krystalografia rentgenowska. W tym rozdziale, na przykładzie wybranych prac badawczych, zostało omówione zastosowanie wymienionych technik w analizie saponin.

Słowa kluczowe: saponiny, triterpeny, analiza spektroskopowa, LC-MS, NMR

## Methods for the structural characterization of triterpene saponins

### Abstract

Saponins are a group of substances composed of the lipophilic part of the aglycone – saponogenin and the hydrophilic glycon, i.e. the sugar part. Individual saponins differ in the type of aglycones as well as in the composition, number, and branching patterns of sugar chains, which results in a large natural variety of saponins. This diversity determines the various biological properties of these compounds. There are many reports in the literature about their anti-inflammatory, antifungal, antiviral, cytotoxic, and antiseptic properties. Saponins are often found in medicinal and edible plants, determining their pharmaceutical and nutraceutical properties. Due to the technical progress and the use of new analytical methods, the number of tested plant species in terms of the content of these compounds is still growing. However, the characteristics of the saponin structure in many plants is still incomplete. Therefore, the selection of appropriate research methods on the structure of saponins seems to be extremely important in the context of determining the relationship between the structure and function and designing drugs of natural origin. In order to identify and characterize compounds isolated from plant material, spectroscopic methods such as nuclear magnetic resonance (NMR), infrared spectroscopy (IR), mass spectrometry (MS), and X-ray crystallography are currently used. In this chapter, the use of these techniques in the analysis of saponins is discussed on the basis of selected publications.

Keywords: saponins, triterpens, spectroscopic analysis, LC-MS, NMR

## **Badania możliwości ługowania kobaltu z polimetalicznego granulatu stopu Cu-Fe-Pb-Co**

### **1. Wprowadzenie**

Komisja Europejska w raporcie dotyczącym kluczowych surowców dla Unii Europejskiej zaliczyła kobalt do materiałów krytycznych [1]. Wynika to głównie z wciąż rosnącego zapotrzebowania na ten metal i jego bardzo niskiej produkcji w krajach Unii Europejskiej. Kobalt jest metalem przejściowym znajdującym szerokie spektrum zastosowań w różnych gałęziach przemysłu [2, 3]. Metal ten ze względu na swoje unikatowe właściwości znajduje zastosowanie w bateriach, superstopach, metalach o wysokiej twardości, katalizatorach, pigmentach, magnezach i inne [4]. W 2020 roku światowa produkcja kobaltu wynosiła 140 000 ton, z czego ponad 70% światowej produkcji pochodziło z Demokratycznej Republiki Kongo (DRC), gdzie usytuowane jest około 50% światowych zasobów tego metalu [5]. Dane te nie uwzględniają wielkości produkcji kobaltu z przerobu materiałów odpadowych, takich jak zużyte baterie czy zużyte katalizatory.

Produkcja miedzi w hutach KGHM Polska Miedź S.A. oparta jest głównie na technologii przerobu koncentratów rud miedzi z wykorzystaniem pieców szybowych oraz pieców zawieszinowych, a także przetopie złomów miedzi poddawanych procesowi pirometalurgicznemu w konwertorach lub piecach anodowych [6]. Koncentraty miedzi przetwarzane przez KGHM Polska Miedź S.A. charakteryzują się zróżnicowaną zawartością kobaltu. Największe stężenie kobaltu występuje w koncentracie Lubin – 1400 ppm, a następnie w koncentracie Rudna – od 480 ppm do 550 ppm, z kolei najniższe w koncentracie Polkowice – 240 ppm [7]. W procesach metalurgicznych przerobu koncentratów miedzi o zachowaniu się poszczególnych metali oraz zwiększaniu ich koncentracji w produktach podstawowych i ubocznych decydują w głównej mierze własności fizykochemiczne metalu lub jego związków oraz rodzaj stosowanej technologii procesu podstawowego – wytopu lub rafinacji miedzi [8]. Kobalt charakteryzuje się dużym powinowactwem chemicznym do tlenu, a zbliżonym do żelaza. Zatem w technologii produkcji miedzi z koncentratów w procesie szybowym kon-

---

<sup>1</sup> joanna.malarz@imn.lukasiewicz.gov.pl, Centrum Hydroelektrometalurgii, Sieć Badawcza Łukasiewicz – Instytut Metali Nieżelaznych, www.imn.gliwice.pl.

<sup>2</sup> grzegorz.benke@imn.lukasiewicz.gov.pl, Centrum Hydroelektrometalurgii, Sieć Badawcza Łukasiewicz – Instytut Metali Nieżelaznych, www.imn.gliwice.pl.

<sup>3</sup> katarzyna.leszczynska-sejda@imn.lukasiewicz.gov.pl, Centrum Hydroelektrometalurgii, Sieć Badawcza Łukasiewicz – Instytut Metali Nieżelaznych, www.imn.gliwice.pl.

<sup>4</sup> karolina.goc@imn.lukasiewicz.gov.pl, Centrum Hydroelektrometalurgii, Sieć Badawcza Łukasiewicz – Instytut Metali Nieżelaznych, www.imn.gliwice.pl.

<sup>5</sup> karolina.pianowska@imn.lukasiewicz.gov.pl, Centrum Hydroelektrometalurgii, Sieć Badawcza Łukasiewicz – Instytut Metali Nieżelaznych, www.imn.gliwice.pl.

centruje się on głównie w kamieniu miedziowym oraz produkcie jego świeżenia – miedziowym żużlu konwertorowym.

W Sieci Badawczej Łukasiewicz – Instytucie Metali Nieżelaznych od kilku lat prowadzone są badania nad opracowaniem kompleksowej technologii odzysku kobaltu z miedziowego żużla konwertorowego pochodzącego z procesu świeżenia kamienia miedziowego. W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań ługowania kobaltu z granulatu stopu Cu-Fe-Pb-Co otrzymanego z miedziowego żużla konwertorowego, pochodzącego od krajowego producenta miedzi.






W literaturze niewiele miejsca poświęcono hydrometalurgicznym procesom przetwarzania stopów Cu-Fe-Pb-Co o podobnym składzie chemicznym co granulatu stopu omówiony w pracy. Opisano jedynie elektrochemiczne roztworzenie stopów: Co-Ni-Cu-Fe [9], Cu<sub>16</sub>-Fe<sub>70</sub>-Co<sub>10</sub>, Cu<sub>70</sub>-Co<sub>4</sub>-Fe<sub>14</sub>-Pb<sub>7</sub> oraz Cu<sub>27</sub>-Co<sub>6</sub>-Fe<sub>64</sub>-Pb<sub>1.5</sub> [10-12] otrzymanych z miedziowego żużla konwertorowego, uzyskanego od KGHM Polska Miedź S.A.

## 2. Materiał do badań

Polimetaliczny granulatu stopu Cu-Fe-Pb-Co otrzymano w procesie świeżenia stopu Cu-Fe-Pb-Co przeprowadzonego w elektrycznym piecu łukowo-oporowym o mocy 80 kVA. Proces ten został wykonany w Zakładzie Hutnictwa, Sieci Badawczej Łukasiewicz – Instytutu Metali Nieżelaznych [13]. Z kolei stop Cu-Fe-Pb-Co został uzyskany z miedziowego żużla konwertorowego otrzymanego w wyniku świeżenia kamienia miedziowego pochodzącego z technologii produkcji miedzi z koncentratów (opartej na procesie szybowym).

Granulatu stopu Cu-Fe-Pb-Co poddano analizie sitowej, co pozwoliło na określenie jego składu granulometrycznego. Wyniki analizy sitowej dla ww. stopu zestawiono w tabeli 1. Granulatu podzielono na 5 frakcji ziarnowych zależnie od wielkości ziarna (tab. 1).

Tabela 1. Wyniki analizy sitowej – wielkość ziarna (mm) oraz udział (% mas.) poszczególnych frakcji ziarnowych granulatu stopu Cu-Fe-Pb-Co

Fracja ziarnowa				
G1	G2	G3	G4	G5
				
Wielkość ziarna, [mm]				
0-1	1-2	2-5	5-10	>10
Udział, [% mas.]				
5,1	2,1	26,3	32,2	34,3

Źródło: Opracowanie własne.

Zgodnie z danymi zamieszczonymi w tabeli 1., najczęściej było frakcji ziarnowej o wielkości ziarna powyżej 10 mm. Analiza składu chemicznego frakcji ziarnowych polimetalicznego stopu Cu-Fe-Pb-Co wykazała, iż poszczególne frakcje ziarnowe w bardzo niewielkim stopniu różnią się zawartością poszczególnych pierwiastków, tj.:

Cu, Fe, Pb, Co, Ni, As oraz Si (tab. 2). Zatem wyjściowym materiałem do badań hydrometalurgicznych była uśredniona próbka granulatu stopu Cu-Fe-Pb-Co o składzie chemicznym (% mas.): Cu – 39,4; Fe – 41,8; Pb – 4,64; Co – 7,29; Ni – 1,88; Si – 0,49; As – 0,66.

Tabela 2. Skład chemiczny (% mas.) poszczególnych frakcji ziarnowych granulatu stopu Cu-Fe-Pb-Co

Frakcja ziarnowa	Cu	Fe	Pb	Co	Ni	Si	As
	[% mas.]						
G1	35,6	38,6	4,15	6,16	1,62	3,01	0,49
G2	39,5	41,3	4,34	6,39	1,67	1,25	0,59
G3	39,8	40,9	4,77	7,36	1,90	0,95	0,67
G4	40,1	42,3	4,61	7,29	1,87	0,07	0,68
G5	38,9	42,4	4,67	7,47	1,92	0,10	0,66
Średnia	39,4	41,8	4,64	7,29	1,88	0,49	0,66

Źródło: Opracowanie własne.

### 3. Metodyka badań

W prowadzonych badaniach ługowania polimetalicznego granulatu stopu Cu-Fe-Pb-Co zastosowano następujące odczynniki chemiczne: 95-98% kwas siarkowy (VI) (cz.d.a., Avantor, Gliwice), 30% roztwór nadtlenu wodoru (cz.d.a., Avantor, Gliwice), 65% kwas azotowy (V) – cz.d.a., Avantor, Gliwice.

Wykonano kilkadziesiąt prób ługowania kobaltu z polimetalicznego granulatu stopu Cu-Fe-Pb-Co w samych roztworach kwasu siarkowego (VI) oraz w roztworach kwasu siarkowego (VI) z dodatkiem utleniaczy. Każdorazowo zmieniano stężenie roztworu ługującego, ilość i rodzaj utleniacza czy stosunek fazy stałej do fazy ciekłej (czynnika ługującego). W pierwszym etapie badań do 100 g próbki granulatu stopu Cu-Fe-Pb-Co wprowadzono 500 cm<sup>3</sup> roztworu kwasu siarkowego (VI) o stężeniu 10%, 15%, 20%, 25% lub 30%. Mieszaninę reakcyjną mieszano (300 obr./min) i ogrzewano w temperaturze powyżej 95°C przez 12 godzin. W kolejnych próbach, po ogrzaniu mieszaniny reakcyjnej do temperatury 95°C, rozpoczęto powolne dodawanie porcjami 30% roztworu nadtlenu wodoru w 15-minutowych odstępach czasowych: 100 cm<sup>3</sup>, 150 cm<sup>3</sup>, 200 cm<sup>3</sup>, 250 cm<sup>3</sup> lub 300 cm<sup>3</sup> w czasie 11 godzin, przy zachowaniu identycznych warunków procesu, jak w pierwszym etapie badań. Przeprowadzono również próby ługowania kobaltu z polimetalicznego granulatu stopu Cu-Fe-Pb-Co w reaktorze pneumomechanicznym wyposażonym w aerator (umożliwiający mieszanie mieszaniny reakcyjnej oraz dyspergowanie gazowego tlenu), termoelektryczny czujnik temperatury w szklanej osłonie, płytę grzewczą wraz z automatycznym sterowaniem oraz szklane naczynie o pojemności 3 dm<sup>3</sup> wraz dwiema pokrywami zawierającymi otwory na termoparę oraz aerator (rys. 1). 300 g porcje granulatu stopu Cu-Fe-Pb-Co i 1,5 dm<sup>3</sup> roztworu kwasu siarkowego (VI) o stężeniu 10%, 15%, 20%, 25% lub 30% mieszano za pomocą aeratora zaopatrzonego w wirnik obracający się z szybkością 1200 obr./min. Po ogrzaniu mieszaniny reakcyjnej do temperatury 95°C, rozpoczęto jej barbotaż gazowym tlenem. Natężenie przepływu gazowego tlenu wynosiło 50 dm<sup>3</sup>/h i kontrolowane było przy użyciu rotametu, proces prowadzono przez 12 godzin.



Rysunek 1. Reaktor pneumomechaniczny wraz z wyposażeniem  
Źródło: Opracowanie własne

W próbach ługowania kobaltu z polimetalicznego granulatu stopu Cu-Fe-Pb-Co zastosowano także 65% kwas azotowy (V). Do 50 g, 75 g, 100 g, 125 g lub 150 g granulatu stopu Cu-Fe-Pb-Co, ługowanego w 1 dm<sup>3</sup> roztworu kwasu siarkowego (VI) o stężeniu 10%, 15%, 20%, 25% lub 30% wprowadzano pierwszą porcję – 35 cm<sup>3</sup> 65% kwasu azotowego (V). Mieszaninę reakcyjną mieszano (300 obr./min) i ogrzewano w temperaturze powyżej 95°C przez 4 godziny, 6 godzin, 8 godzin 10 lub 12 godzin. Drugą porcję – 30 cm<sup>3</sup> 65% kwasu azotowego (V) – dodawano do mieszaniny reakcyjnej po upływie połowy zadanego czasu procesu ługowania. Po zakończeniu procesu, mieszaninę poreakcyjną filtrowano, a następnie mierzono pH przesączu. Nie-roztworzony materiał wraz z wytrąconym osadem – siarczanem (VI) ołowiu (II) – przemywano na sączku (50-75 cm<sup>3</sup> wody destylowanej), a następnie suszono do uzyskania stałej masy, w temperaturze 100°C przez 5 godzin. We wszystkich przeprowadzonych próbach stosowano taką samą procedurę.

Roztwory po ługowaniu i granulatu stopu Cu-Fe-Pb-Co analizowane były w Zakładzie Chemii Analitycznej, Sieci Badawczej Łukasiewicz – Instytutu Metali Nieżelaznych. Zawartość poszczególnych pierwiastków (Cu, Fe, Pb, Co i pozostałych) oznaczano za pomocą ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma Mass-Spectroscopy*, Nexion, PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Wydajność ługowania kobaltu, żelaza i miedzi, które obecne były w roztworach po ługowaniu, obliczono zgodnie z równaniem (1) [14]:

$$Y = \frac{c \times v}{m \times w} \times 100\% \quad (1)$$

gdzie: c – stężenie metalu w roztworze po ługowaniu (g/dm<sup>3</sup>); v – objętość roztworu po ługowaniu (dm<sup>3</sup>); m – masa materiału wejściowego (g); w – zawartość kobaltu, żelaza oraz miedzi w materiałach wejściowych.

## 4. Wyniki badań

### 4.1. Wpływ stężenia kwasu siarkowego (VI) na wydajność ługowania

Zbadano wpływ stężenia kwasu siarkowego (VI) – 10-30% – na wydajność ługowania Co oraz Fe i Cu z granulatu stopu. W wyniku przeprowadzonych operacji ługowania granulatu stopu Cu-Fe-Pb-Co, okazało się, że do roztworów przechodzi głównie



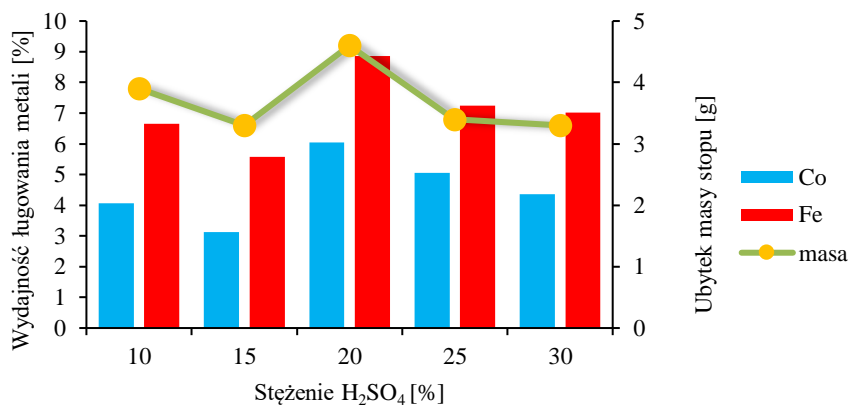
Co oraz Fe, natomiast Cu pozostaje w nieroztworzonej części materiału. Wydajność ługowania Cu we wszystkich wykonanych próbach nie przekraczała 1% (tab. 3). Z kolei Pb obecny w granulatach stopu Cu-Fe-Pb-Co stanowił osad, wytrącony w postaci siarczanu (VI) ołowiu (II).

Tabela 3. Wyniki prób ługowania granulatu stopu w roztworach kwasu siarkowego (VI); warunki procesu ługowania: 100 g granulatu stopu Cu-Fe-Pb-Co, stosunek fazy stałej do fazy ciekłej – 1 : 5,  $\geq 95^{\circ}\text{C}$ , 12 h

Nr próby	Stężenie $\text{H}_2\text{SO}_4$ , [%]	Objętość przesączu, [ $\text{cm}^3$ ]	pH	Wydajność ługowania, [%]		
				Co	Cu	Fe
1	10	550	0,83	4,07	0,004	6,65
2	15	555	0,65	3,12	0,009	5,57
3	20	545	0,50	6,05	0,009	8,86
4	25	550	0,20	5,05	0,003	7,24
5	30	600	0,08	4,36	0,004	7,03

Źródło: Opracowanie własne

Co ważne, zastosowanie 30% roztworu kwasu siarkowego (VI) nie spowodowało istotnej poprawy wydajności ługowania Co i pozostałych metali z granulatu stopu Cu-Fe-Pb-Co. Najwyższą wydajność ługowania Co – 6,05%, a także Fe – 8,86% osiągnięto przy użyciu jako roztworu ługującego 20% roztworu kwasu siarkowego (VI). W zadanych warunkach procesu ługowania (tab. 3) granulaty stopu Cu-Fe-Pb-Co praktycznie nie ulegały rozтворzeniu. Ubytek masy próbki granulatu stopu (masa stopu przed i po ługowaniu) w wykonanych próbach nie przekraczał 5 g, co w oczywisty sposób przekładało się na bardzo niską wydajność ługowania metali (wyk. 1).



Wykres 1. Wydajność ługowania metali (Co oraz Fe) i utrata masy granulatu stopu Cu-Fe-Pb-Co w funkcji stężenia roztworu kwasu siarkowego (VI). Źródło: Opracowanie własne

Wobec negatywnych wyników procesu ługowania Co oraz pozostałych metali w samych roztworach kwasu siarkowego(VI), kolejne próby wykonano z zastosowaniem różnych utleniaczy, stanowiących dodatek do roztworów kwasu siarkowego (VI). Powinny one wpłynąć na przyspieszenie procesu ługowania granulatu stopu Cu-Fe-Pb-Co i tym samym zwiększyć w znaczący sposób wydajność ługowania Co i innych metali.

## 4.2. Wpływ dodatku roztworu nadtlenu wodoru na wydajność ługowania

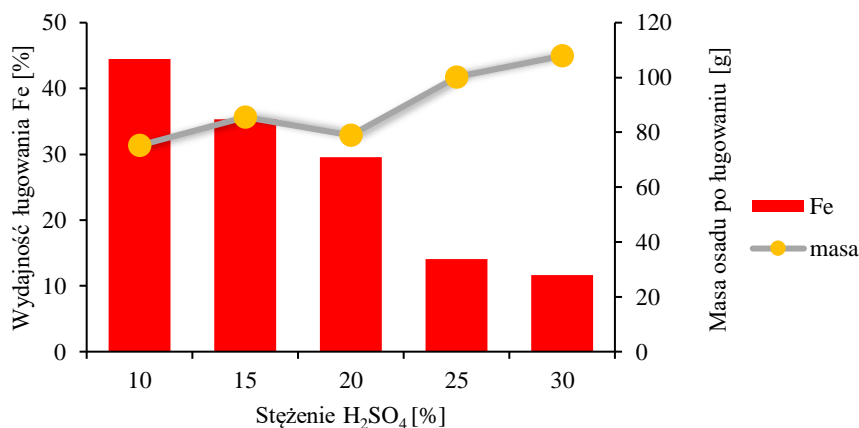
Wykonano próby ługowania granulatu stopu Cu-Fe-Pb-Co w roztworach kwasu siarkowego (VI) (10-30%) z dodatkiem stałej ilości 30% roztworu nadtlenu wodoru (tab. 4). Zaobserwowano, że wraz ze zwiększaniem się stężenia roztworu kwasu siarkowego (VI) następował wzrost wydajności ługowania Co oraz w mniejszym stopniu Cu (tab. 4). Stwierdzono, że największą wydajność ługowania Co – 61,7%, otrzymano dla 30% roztworu kwasu siarkowego (VI). Zapewne również wraz ze wzrostem stężenia roztworu kwasu siarkowego (VI) zwiększa się także stężenie Fe w roztworze. Jednak uzyskane wyniki dla tych roztworów po ługowaniu tego nie potwierdzają.

Tabela 4. Wyniki prób ługowania granulatu stopu w roztworach kwasu siarkowego (VI) w obecności  $H_2O_2$  (200  $cm^3$ ); warunki procesu ługowania: 100 g granulatu stopu Cu-Fe-Pb-Co, stosunek fazy stałej do fazy ciekłej (czynnika ługującego) – 1 : 5,  $\geq 95^\circ C$ , 12 h

Nr próby	Stężenie $H_2SO_4$ , [%]	Objętość przesączu, [ $cm^3$ ]	pH	Wydajność ługowania, [%]		
				Co	Cu	Fe
6	10	605	1,02	43,8	9,70	44,5
7	15	550	2,14	47,7	23,2	35,3
8	20	580	2,15	52,9	33,1	29,6
9	25	550	1,68	54,7	37,3	14,1
10	30	590	1,85	61,7	36,6	11,7

Źródło: Opracowanie własne.

Zaobserwowaną zależność, a mianowicie zmniejszenie się wydajności ługowania Fe wraz ze wzrostem stężenia roztworu kwasu siarkowego (VI), co obrazuje tabela 4 oraz wykres 2, można wytłumaczyć częściowym rozkładem wolnego kwasu siarkowego (VI) pod wpływem utleniacza – 30% roztworu nadtlenu wodoru. Przejawem tego był zaobserwowany wzrost wartości pH od 1,68 do 2,15 w roztworach po ługowaniu (tab. 4). Jak wiadomo, przy takich wartościach pH – Fe ulegało hydrolytycznemu wytrąceniu z roztworów w postaci wodorotlenków (tab. 4, wyk. 2) [15, 16].



Wykres 2. Wydajność ługowania Fe oraz masa osadu po ługowaniu w funkcji stężenia kwasu siarkowego (VI).

Źródło: Opracowanie własne

Wykonano także próby ługowania granulatu stopu Cu-Fe-Pb-Co w 10% roztworze kwasu siarkowego (VI) z dodatkiem różnych ilości utleniacza – 30% roztworu nadtlenku wodoru (100-300 cm<sup>3</sup>). W oparciu o uzyskane wyniki (tab. 5) stwierdzono, że trzykrotne zwiększenie ilości (mianowicie ze 100 cm<sup>3</sup> do 300 cm<sup>3</sup>) 30% roztworu nadtlenku wodoru wprowadzanego do układu reakcyjnego spowodowało zaledwie dwukrotny wzrost wydajności ługowania Co, Fe oraz podobnie Cu. Ze względu na fakt, że wprowadzany do mieszaniny reakcyjnej utleniacz konieczny do wyługowania Cu z granulatu stopu ulegał częściowemu rozkładowi, wydajność ługowania Cu niestety nie przekraczała 32,3%. Najwyższą wydajność ługowania Co – 50,1% oraz Fe – 51,0% otrzymano przy zastosowaniu jako czynnika ługującego 10% roztworu kwasu siarkowego (VI) – z dodatkiem aż 300 cm<sup>3</sup> – 30% roztworu nadtlenku wodoru (tab. 5).

Tabela 5. Wyniki prób ługowania granulatu stopu w 10% roztworze kwasu siarkowego (VI) w obecności różnych ilości utleniacza – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (warunki procesu ługowania: 100 g granulatu stopu Cu-Fe-Pb-Co, stosunek fazy stałej do fazy ciekłej (czynnika ługującego) – 1 : 5, ≥95°C, 12 h)

Nr próby	Objętość 30% r-ru H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , [cm <sup>3</sup> ]	Objętość przesączu, [cm <sup>3</sup> ]	pH	Wydajność ługowania, [%]		
				Co	Cu	Fe
11	100	555	1,06	31,6	0,01	33,2
12	150	600	1,07	35,0	1,28	37,5
13	200	600	1,11	40,0	2,90	42,0
14	250	595	1,22	42,1	1,48	43,7
15	300	670	1,28	50,1	3,49	51,0

Źródło: Opracowanie własne.

### 4.3. Wpływ obecności gazowego tlenu na wydajność ługowania

Wykonano testy ługowania granulatu stopu Cu-Fe-Pb-Co w roztworach kwasu siarkowego (VI) (10-30%) w obecności gazowego tlenu. Próby te przeprowadzono w reaktorze pneumomechanicznym. Okazało się, że granulatu stopu Cu-Fe-Pb-Co w zadanych warunkach procesu ługowania roztwarzał się w minimalnym stopniu. Ubytek masy granulatu stopu (masa granulatu stopu przed i po ługowaniu) był bardzo niewielki i wynosił od 7,1 g do 8,3 g, co stanowiło niecałe 3% masy próbki użytej w wykonanych badaniach. Zatem stężenie roztworu kwasu siarkowego(VI) i obecność gazowego tlenu w trakcie procesu ługowania granulatu stopu Cu-Fe-Pb-Co w bardzo niewielkim stopniu wpływa na wydajność ługowania Co, Fe oraz Cu (tab. 6). Do roztworu ługującego przechodzi tylko Co oraz Fe, i to w nieznaczącej ilości, z kolei Cu w dalszym ciągu pozostaje w nieroztworzonej części materiału wraz z wytraconym Pb w postaci osadu siarczanu (VI) ołowiu (II). Co istotne, najwyższą wydajność ługowania Co oraz Fe otrzymano w przypadku zastosowania następujących warunków: 30% roztworu kwasu siarkowego (VI), barbotażu mieszaniny ługującej tlenem (przepływ O<sub>2</sub> – 50 dm<sup>3</sup>/h), stosunku fazy stałej do fazy ciekłej – 1 : 5 oraz temperatury ≥ 95°C, w czasie 12 godzin (tab. 6).

Tabela 6. Wyniki prób ługowania granulatu stopu roztworami kwasu siarkowego (VI) w obecności gazowego tlenu (warunki procesu ługowania: 300 g granulatu stopu Cu-Fe-Pb-Co, stosunek fazy stałej do fazy ciekłej – 1 : 5, przepływ O<sub>2</sub> – 50 dm<sup>3</sup>/h, obroty wimika – 1200 obr./min, ≥ 95°C, 12 h)

Nr próby	Stężenie H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> [%]	Objętość przesączu [cm <sup>3</sup> ]	pH	Wydajność ługownia [%]		
				Co	Cu	Fe
16	10	1550	0,73	10,1	0,003	11,9
17	15	1620	0,74	9,9	0,002	12,5
18	20	1540	0,67	10,3	0,001	13,3
19	25	1575	0,27	9,8	0,002	12,1
20	30	1565	0,37	11,4	0,004	13,6

Źródło: Opracowanie własne.

#### 4.4. Wpływ obecności kwasu azotowego (V) na wydajność ługowania

W dotychczas wykonanych próbach roztwarzania granulatu stopu Cu-Fe-Pb-Co nie udało się wyługować całego Co zawartego w badanym materiale. Dlatego przeprowadzono próby ługowania granulatu stopu Cu-Fe-Pb-Co w roztworze kwasu siarkowego (VI) (10-30%) z dodatkiem silnego utleniacza, którego rolę pełnił 65% kwas azotowy (V) (tab. 7). Zaobserwowano, że wraz ze wzrostem stężenia roztworu kwasu siarkowego (VI), przy stałej ilości 65% kwasu azotowego (V), zwiększa się ilość roztwarzanego materiału (tab. 7). W efekcie zwiększa się również stężenie Co, Fe oraz Cu w roztworze po ługowaniu, ale tylko przy stężeniu roztworu kwasu siarkowego (VI) mieszczącym się w zakresie 10-20% (tab. 7). Okazało się, że największą wydajność ługowania Co – 98,7%, Fe – 99,9% i Cu – 90,3% otrzymano stosując jako czynnik ługujący 20% roztwór kwasu siarkowego (VI) (tab. 7). Stąd wniosek, że kolejne testy ługowania granulatu stopu Cu-Fe-Pb-Co powinny zostać przeprowadzone w 20% roztworze kwasu siarkowego (VI) z dodatkiem stałej ilości utleniacza – 65% kwasu azotowego(V). Zaobserwowany spadek wydajności ługowania Co, Fe oraz Cu przy zastosowaniu 30% roztworu kwasu siarkowego (VI) był spowodowany wytrąceniem się kryształów soli Cu, Co oraz Fe obecnych w mieszaninie po ługowaniu, po jej przednim ochłodzeniu do temperatury pokojowej.

Tabela 7. Wyniki prób ługowania granulatu stopu w roztworze kwasu siarkowego (VI) z dodatkiem utleniacza – HNO<sub>3</sub> (65 cm<sup>3</sup>); warunki procesu ługowania: 100 g granulatu stopu Cu-Fe-Pb-Co, stosunek fazy stałej do fazy ciekłej (czynnika ługującego) – 1 : 5, ≥95°C, 12 h)

Nr próby	Stężenie H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> [%]	Objętość przesączu [cm <sup>3</sup> ]	pH	Wydajność ługownia [%]		
				Co	Cu	Fe
21	10	925	0,93	91,1	59,0	91,9
22	15	975	0,42	99,9	79,5	98,3
23	20	1010	0,45	98,7	90,3	99,9
24	25	1050	0,14	99,9	64,3	99,9
25	30	1045	0,19	78,5	86,0	77,6

Źródło: Opracowanie własne

W kolejnych próbach różne ilości granulatu stopu Cu-Fe-Pb-Co (50-150 g) ługowano przy użyciu 20% roztworu kwasu siarkowego (VI) z dodatkiem 65 kwasu azotowego (V). Najlepszą wydajność ługowania Co, Fe oraz Cu otrzymano przy stosunku fazy stałej do fazy ciekłej (czynnika ługującego) wynoszącym odpowiednio: 0,75 : 10 (przykład 27, tab. 8) i 1 : 10 (przykład 28, tab. 8). Warto w tym miejscu dodać, iż wykonana analiza składu chemicznego osadu jednej z tych prób (przykład 26, tab. 8) jednoznacznie potwierdziła, że Pb wytrąca się w trakcie procesu ługowania granulatu stopu Cu-Fe-Pb-Co w postaci siarczanu (VI) ołowiu (II). Skład chemiczny (% mas.) osadu: Pb – 53,9; Co – 0,01; Fe – 0,45; Cu – 0,29 (przykład 26, tab. 8).

Tabela 8. Wyniki prób ługowania różnych ilości (50-150 g) granulatu stopu w 20% roztworem kwasu siarkowego (VI) w obecności utleniacza – HNO<sub>3</sub> (65 cm<sup>3</sup>); (warunki procesu ługowania: ≥ 95°C, 12 h)

Nr próby	Ilość granulatu stopu [g]	Objętość przesączu [cm <sup>3</sup> ]	pH	Wydajność ługownia [%]		
				Co	Cu	Fe
26	50	705	0,53	77,9	80,2	77,7
27	75	1030	0,68	98,3	99,9	95,4
28	20	1010	0,45	98,7	90,3	99,9
29	125	990	0,67	84,5	67,6	85,5
30	150	1020	0,76	74,9	51,3	75,1

Źródło: Opracowanie własne.

Przeprowadzone badania ługowania Co, Fe oraz Cu z granulatu stopu Cu-Fe-Pb-Co potwierdziły wcześniej wykonane obliczenia (w oparciu o stechiometrię reakcji ługowania składników zawartych w materiale). Zatem najlepiej ługowanie granulatu stopu prowadzić przy następujących warunkach: 20% roztwór kwasu siarkowego (VI), dodatek 65% kwasu azotowego (V), stosunek fazy stałej do fazy ciekłej (czynnika ługującego) – 1 : 10, ≥95°C.

Sprawdzono również wpływ czasu (4-12 h) procesu ługowania granulatu stopu Cu-Fe-Pb-Co na wydajność ługowania Co, Fe i Cu (tab. 9). W oparciu o uzyskane wyniki stwierdzono, że czas trwania procesu ługowania granulatu stopu wpływa na wydajność ługowania cennych metali w niewielkim stopniu (tab. 9). Najlepszą wydajność ługowania Co – 96,1%, Fe – 98,2% oraz Cu – 94,3% (przykład 33, tab. 9) otrzymano dla procesu ługowania prowadzonego przez 8 godzin.

Tabela 9. Wyniki prób ługowania granulatu stopu w roztworach kwasu siarkowego (VI) w obecności utleniacza – HNO<sub>3</sub> (65 cm<sup>3</sup>); warunki procesu ługowania: 100 g granulatu stopu Cu-Fe-Pb-Co, stosunek fazy stałej do fazy ciekłej (czynnika ługującego) – 1 : 10, ≥95°C

Nr próby	Czas ługowania [h]	Objętość przesączu [cm <sup>3</sup> ]	pH	Wydajność ługownia [%]		
				Co	Cu	Fe
31	4	1060	0,40	89,4	81,3	89,1
32	6	970	0,75	90,4	85,7	91,8
33	8	990	0,71	96,1	94,3	98,2
34	10	1040	0,92	93,1	87,7	95,4
35	12	1270	0,79	93,7	87,7	95,5

Źródło: Opracowanie własne.

## 5. Wnioski

W pracy przedstawiono uzyskane wyniki z przeprowadzonych badań ługowania polimetalicznego granulatu stopu Cu-Fe-Pb-Co o składzie chemicznym (% mas.): Cu – 39,4; Fe – 41,8; Pb – 4,64; Co – 7,29; Ni – 1,88; Si – 0,49; As – 0,66. Próby ługowania ww. granulatu stopu prowadzono w roztworach kwasu siarkowego (VI), 10-30%, bez udziału utleniaczy oraz z udziałem utleniaczy – 30% roztworu nadtlenu wodoru, gazowego tlenu oraz 65% kwasu azotowego (V). Na podstawie przeprowadzonych prób ługowania polimetalicznego granulatu stopu Cu-Fe-Pb-Co sformułowano następujące wnioski:

- proces ługowania Co oraz pozostałych metali (Fe i Cu) z granulatu stopu Cu-Fe-Pb-Co należy prowadzić w temperaturze  $\geq 95^{\circ}\text{C}$ , przez 8 godzin, stosując jako roztwór ługujący 20% roztwór kwasu siarkowego (VI) z dodatkiem 65% kwasu azotowego (V);
- stosunek fazy stałej do fazy ciekłej (czynnika ługującego) powinien wynosić 1 : 10;
- dodatek 65% kwasu azotowego (V) powinien wynosić około 6% objętości 20% roztworu kwasu siarkowego(VI).

Wyżej wymienione warunki pozwalają na uzyskanie ponad 96% wydajności ługowania Co z granulatu stopu Cu-Fe-Pb-Co. Stwierdzono również, iż nie można w pełni selektywnie wyługować z badanego materiału Co, ponieważ w trakcie procesu ługowania do roztworu w mniejszym bądź większym stopniu, zależnie od stosowanych warunków, przechodzi Fe i Cu. Zatem w celu odzysku Co z granulatu stopu konieczne jest rozтворzenie całej próbki materiału.

## Literatura

1. European Commission, *Study on the EU's list of Critical Raw Materials – final report*, 2020, ISBN 978-92-76-21049-8, doi: 10.2873/11619.
2. Enghang P., *Encyclopedia of the Elements*, WILEY-VCH, Weinheim 2004, s. 1059-1071.
3. Nordberg G. F., Fowler B.A., Nordberg M., *Handbook on the toxicology of metals*, Elsevier, 2015.
4. Petavratzi E., Gunn G., Kresse C., *BGS Commodity review: cobalt*, British Geological Survey, 2019.
5. U.S. Geological Survey, *Mineral commodity summaries*, 2021, <https://doi.org/10.3133/mcs2021>. ISBN 978-1-4113-4398-6.
6. Makuch M., *65 lat Huty Miedzi Legnica*, KGHM Polska Miedź S.A., Oddział Huta Miedzi Legnica, 2018.
7. Czernecki J., Krawiec G., *Analiza występowania pierwiastków krytycznych w najważniejszych produktach ciągów technologicznych KGHM Polska Miedź S.A. wraz z oceną perspektyw ich odzysku – Etap III*, sprawozdanie KGHM Cuprum Sp. z o. o., Wrocław 2015.
8. Hadryś E., Mierzwa L., Banaszak A., Butra J., Grotowski A., Lewiński J., Stec J., Mizera A., Piątkowski J., Hac D., *Monografia KGHM Polska Miedź S.A., KGHM CUPRUM Sp. z o.o. CBR*, Wrocław 2008, ISBN: 978-83-922065-7-6.
9. Włodyka J., *Elektrochemiczne rozwarzanie stopu Co, Ni, Fe, Co*, Rudy i Metale Nieżelazne, 46(8), 2001, s. 369-372.
10. Burzyńska L., Gumowska W., Rudnik E., Partyka J., Szymańska W., *Mechanism of the anodic dissolution of Fe70–Cu16–Co10 alloy originated from reduced copper converter slag in ammoniacal solutions: recovery of copper and cobalt*, Archives of Metallurgy and Materials, 53, 2008, s. 1007-1016.

11. Burzyńska L., Gumowska W., Rudnik E., Partyka J., *Mechanism of the anodic dissolution of Cu70-Co4-Fe-14-Pb7 alloy originated from reduced copper converter slag in an ammoniacal solution. Recovery of copper and cobalt*, Hydrometallurgy, 92, 2008, 34-41.
12. Rudnik E., Burzyńska L., Gumowska W., *Hydrometallurgical recovery of copper and cobalt from reduction-roasted copper converted slag*, Minerals Engineering, 22, 2009, s. 88-95.
13. Kortyka Ł., Krawiec G., Gębczyk W., Madej P., Sak T., Bratek S., Szołomicki Z., Kozłowicz S., Knapiak M., *Usuwanie żelaza ze stopu kobaltowego w procesie świeżenia w pilotowym piecu elektrycznym*, Sprawozdanie IMN nr 7601/17, Gliwice 2017.
14. Khalid M.K., Hamuyuni J., Agarwal V., Pihlasalo J., Haapalainen M., Lundstrom M., *Sulfuric acid leaching for capturing value from copper rich converter slag*, Journal of Cleaner Production, 215, 2019, s. 1005-1013.
15. Mbedzi N., Iban D., Dyer L., *The effect oxidation on ferrous iron removal from multi-element acidic sulphate solutions*, AIP Conference Proceedings, 1805, 2017.
16. Yue T., Han H., Sun W., Hu Y., Chen P., Liu R., *Low-pH mediated goethite precipitation and nickel loss in nickel hydrometallurgy*, Hydrometallurgy, 165, 2016, s. 238-243.

## **Badania możliwości ługowania kobaltu z polimetalicznego granulatu stopu Cu-Fe-Pb-Co**

### Streszczenie

W pracy omówiono wyniki badań dotyczące przetwarzania granulatu stopu Cu-Fe-Pb-Co. Granulat ww. stopu uzyskano w procesie świeżenia stopu Cu-Fe-Pb-Co otrzymanego z żużła konwertorowego. Materiałem wyjściowym do badań hydrometalurgicznych były uśrednione próbki granulatu stopu Cu-Fe-Pb-Co o składzie chemicznym (% mas.): Co – 7,29, Fe – 41,8, Pb – 4,64, Cu – 39,4, As – 0,66, Si – 0,49 oraz Ni – 1,88. Wstępnie przeprowadzono próby ługowania granulatu stopu Cu-Fe-Pb-Co przy użyciu 10-30% roztworu kwasu siarkowego (VI) z dodatkiem lub bez dodatku utleniaczy. Jako utleniacze stosowano gazowy tlen lub 30% wodny roztwór nadtlenu roztworu. Zastosowane warunki nie pozwoliły jednak na pełne rozтворzenie ww. granulatu, a co za tym idzie całkowite wyługowanie kobaltu z materiału. Dalsze próby wykazały, że najkorzystniejszym sposobem ługowania jest wykorzystanie jako czynnika ługującego 20% roztworu kwasu siarkowego (VI) z dodatkiem silnego utleniacza, którego rolę pełnił 65% kwas azotowy (V). Analiza wyników eksperymentów wykazała, że ługowanie należy prowadzić w temperaturze 95°C, przez 8 godzin. Stosunek fazy stałej do ciekłej powinien wynosić 1 : 10 i należy stosować 65% kwas azotowy (V) w ilości ~6% objętości roztworu kwasu siarkowego (VI). Powyższe warunki pozwalają na uzyskanie ponad 96% wydajności ługowania kobaltu.

Słowa kluczowe: kobalt, stop Cu-Fe-Pb-Co, żużel konwertorowy, ługowanie

## **Research on the possibility of cobalt leaching from the polymetallic granular Cu-Fe-Pb-Cu alloy**

### Abstract

This work presents the results of the research on the processing of a granular Cu-Fe-Pb-Co alloy. The granule of the aforementioned material were obtained in the refining process of Cu-Fe-Pb-Co alloy from converter slag. The starting material for the hydrometallurgical tests were averaged samples of the granulated Cu-Fe-Pb-Co alloy with the chemical composition (wt. %): Co – 7.29, Fe – 41.8, Pb – 4.64, Cu – 39.4, As – 0.66, Si – 0.49 and Ni – 1.88. Initial leaching tests of the granular Cu-Fe-Pb-Co alloy were carried out with the use of 10-30% sulfuric acid solutions and the addition of oxidizing agents. Gaseous oxygen and 30% hydrogen peroxide solution were used as oxidants. However, the applied conditions did not allow for the full dissolution of the granulate, and thus the complete leaching of cobalt from the material. Further experiments showed that the most effective method of processing is using 20% sulfuric acid solution as a leaching agent with the addition of a strong oxidizing agent, such as 65% nitric acid. The analysis of the research results proved that the leaching should be conducted at 95°C for 8 hours. The solid to liquid phase ratio – 1 : 10 and 65% nitric acid in the amount of ~6% of the volume of sulfuric acid solution should be used. These conditions allow to obtain more than 96% efficiency of cobalt leaching.

Keywords: cobalt, Cu-Fe-Pb-Co alloy, converter slag, leaching

# Narażenie na promieniowanie jonizujące i ochrona radiologiczna w badaniach naukowych

## 1. Wstęp

Techniki radioizotopowe należą do najbardziej czułych i dokładnych metod badawczych. Coraz rzadsze wykorzystywanie tych technik wynika często z obawy przed promieniowaniem jonizującym, które im towarzyszy. Administracja Śląskiego Uniwersytetu Medycznego informuje, że w latach 2012-2021 na terenie SUM zlikwidowano ostatnie trzy pracownie izotopowe. Porównanie średnich dawek promieniowania jonizującego otrzymywanych przez osoby zawodowo narażone na promieniowanie z dawkami uzyskiwanymi od źródeł naturalnych może skorygować wyobrażenie o zagrożeniu i przesądzić, że młodzi pracownicy nauki sięgną po radioizotopy. Poznanie podstaw prawnych, podstawowych pojęć i zasad z zakresu ochrony radiologicznej pozwala już na wstępie ocenić, czy otoczenie w jakim działamy, ograniczenia lokalowe, pozwolą na wdrożenie tych technik. Niejednokrotnie możliwość wykorzystania izotopów promieniotwórczych okazuje się być jedynym narzędziem, które pozwoli osiągnąć określony cel badawczy z zakresu nauk biomedycznych, biologii, chemii, paleontologii, rolnictwa czy ochrony środowiska. Zapoznanie się z przykładami takich zastosowań może zainspirować do wykorzystania tych metod w badaniach własnych.

## 2. Wszechobecne promieniowanie jonizujące

Promieniowanie jonizujące nieodłącznie towarzyszy człowiekowi a izotopy promieniotwórcze występują w naszym środowisku naturalnym i w nas samych. Największym naturalnym źródłem promieniowania jest radon, pochodzi on z szeregów promieniotwórczych uranu i toru. Jest to bezwonny i bezbarwny gaz szlachetny wydobywający się z gleby i skał, który na co dzień wdychamy.

Podstawowym parametrem charakteryzującym źródła promieniowania jest ich radioaktywność, wyrażamy ją w bekerelach (Bq). Aktywność 1 Bq oznacza jedną przemianę jądrową w czasie jednej sekundy. Średnie stężenie radonu na świeżym powietrzu w Polsce zawiera się w granicach od 2,7 Bq/m<sup>3</sup> (w Warszawie) do 30 Bq/m<sup>3</sup> (w Kowarach), natomiast w mieszkaniach 40 Bq/m<sup>3</sup> [1].

W glebie i skałach znajdują się różne izotopy promieniotwórcze. Stężenie izotopów promieniotwórczych w mleku stanowi istotny wskaźnik oceny narażenia radiacyjnego drogą pokarmową. Najistotniejszym jest izotop potasu-40, daje on największy wkład do wewnętrznego napromieniowania człowieka, a monitorowana średnia radioaktywność tego izotopu w mleku w Polsce wynosi ok. 43 Bq/litr [2].

Tona popiołu ze spalonego węgla zawiera tyle izotopów promieniotwórczych, że jej radioaktywność możemy wyrażać w milionach Bq [3].

---

<sup>1</sup> abogacz@sum.edu.pl, Katedra i Zakład Biofizyki, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.sum.edu.pl.



Radionuklidy docierają do człowieka w ten sam sposób jak inne pierwiastki, w każdym żywym organizmie znajdują się naturalne substancje wykazujące promieniotwórczość. Trafiają tam z naszego otoczenia razem ze spożywanym pokarmem, wdychanym powietrzem lub przez skórę.

Całkowita aktywność naturalnych izotopów promieniotwórczych w organizmie każdego z nas (umowny wzrost 170 cm i waga 70 kg) wynosi ok. 8000 Bq. Składa się na to głównie radioaktywny potas-40, około 4000 Bq i węgiel-14, około 2500 Bq [1]. Oznacza to, że w ciągu jednej sekundy w naszym ciele następuje średnio 8000 rozpadów promieniotwórczych.

Promieniowanie jonizujące które na nas oddziałuje pochodzi również z kosmosu. Słońce i wszystkie gwiazdy to niczym nie osłonięte reaktory jądrowe. Pole magnetyczne Ziemi i jej atmosfera chronią nas przed promieniowaniem kosmicznym, ochrona atmosfery jest tym skuteczniejsza, im grubsza jest jej warstwa. Mieszkańcy wybrzeża morskiego są więc lepiej chronieni niż ci, którzy żyją w górach. Szczególnie narażeni na to promieniowanie są kosmonauci i załogi samolotów.

Miarą narażenia organizmu żywego na promieniowanie jonizujące jest dawka promieniowania. Uwzględnia ona jego ilość, rodzaj, jak również rodzaj napromienianych tkanek i narządów, wyrażamy ją w sivertach (Sv). Dawka skuteczna określa stopień narażenia całego ciała na promieniowanie nawet przy napromienianiu tylko niektórych jego partii.

Jednym z najważniejszych wskaźników opisujących skutki ostrego napromienienia jest pojęcie dawki śmiertelnej po 60 dniach (LD 50/60). Jest to dawka pochłonięta powodująca śmierć u 50% napromienianej populacji w ciągu 60 dni. Wartość LD 50/60 oszacowana na poziomie około 3,5-4,0 Sv dotyczy osób leczonych bez specjalistycznego wsparcia [4].

Wszechobecne promieniowanie jonizujące pochodzące od środowiska w jakim żyjemy obciąża nas dawką rzędu kilku milisivertów w ciągu roku. Wartość tej dawki jest zależna od podłoża geologicznego, na jakim żyjemy, wysokości nad poziomem morza oraz ilości pochłoniętego promieniowania pochodzącego ze źródeł sztucznych. Źródłami sztucznego promieniowania jonizującego są głównie procedury medyczne oraz skutki awarii elektrowni jądrowych.

Całkowita roczna dawka skuteczna promieniowania jonizującego otrzymana przez statystycznego mieszkańca Polski w 2020 roku była równa 3,96 mSv. Składa się na nią promieniowanie od źródeł naturalnych: około 2,45 mSv i od źródeł sztucznych: 1,51 mSv. Największy procentowy wkład pochodził od radonu: 30,3% i diagnostyki medycznej: 37,9% [5].

Nie ma żadnych przesłanek, aby obawiać się dawek mieszczących się w zakresie promieniowania naturalnego, wszelkie organizmy żywe wykształciły dostateczne mechanizmy obronne przed tak małymi dawkami promieniowania.

### **3. Ochrona radiologiczna**

Naturalne źródła promieniowania nie stanowią zagrożenia dla człowieka, ale od ponad stu lat potrafimy wytwarzać sztuczne źródła promieniowania jonizującego które stanowią poważne zagrożenie dla naszego zdrowia i życia. Moc promieniowania źródeł sztucznych może wielokrotnie przewyższać moc promieniowania naturalnego.

Wprowadzone regulacje prawne nakazują monitorowanie dawek promieniowania, na jakie są narażeni ludzie. Szczególną grupą ludności są pracownicy zawodowo narażeni na promieniowanie. Dla tej grupy określono tak zwaną dawkę graniczną, która wynosi 20 mSv [6].

Przykładowo w lotnictwie cywilnym roczna ekspozycja na załogę na trasach międzynarodowych szacowana jest na poziomie 4,8 mSv [7].

Instytut Medycyny Pracy w Łodzi przeprowadził ocenę narażenia zawodowego na promieniowanie na grupie ponad 27 tys. osób zatrudnionych w 3808 zakładach pracy. Wyniki badań zostały zawarte w tabelach 1 i 2.

Tabela 1. Zawodowe narażenie na promieniowanie X i  $\gamma$  w zakładach i laboratoriach w roku 2010 [8]

Typ zakładu	Badani		Zakłady	
	n	%	n	%
Służba zdrowia	24173	89,4	3303	86,7
Wojewódzkie stacje sanitarno-epidemiologiczne	133	0,5	21	0,6
Szkoły medyczne	395	1,5	13	0,3
Zakłady przemysłowe	978	3,6	153	4,0
Placówki naukowo-badawcze	490	1,8	103	2,7
Zakłady techniki medycznej	107	0,4	23	0,6
Inne	763	2,8	193	5,1
Razem	27039	100	3808	100

Tabela 2. Indywidualne równoważniki dawek Hp(10) w populacji osób zawodowo narażonych na promieniowanie rentgenowskie i gamma w 2010 r. w różnych typach zakładów[8]

Typ zakładu	Średnia dawka [mSv]	Max dawka [mSv]	Roczna dawka [mSv]				
			Narażeni na poszczególne dawki [%]				
			0-1	1-2	2-6	6-15	15-20
Służba zdrowia	0,50	17,9	99,28	0,31	0,34	0,05	0,02
Wojewódzkie stacje sanitarno-epidemiologiczne	0,47	0,70	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Szkoły medyczne	0,25	0,50	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Zakłady przemysłowe	0,55	15,50	98,47	0,82	0,61	0,00	0,01
Placówki naukowo-badawcze	0,45	0,60	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Zakłady techniki medyczne	0,47	3,00	98,14	0,93	0,93	0,00	0,00
Inne	0,45	9,70	99,74	0,13	0,00	0,13	0,00

(Indywidualne równoważniki dawek Hp(10) w rozumieniu oceny dawek efektywnych na całe ciało)

Z analizy przeprowadzonych badań wynika, że nie odnotowano żadnego przypadku przekroczenia rocznego limitu dawki, a jej średnia wartość w odniesieniu do placówek naukowo-badawczych jest mniejsza niż 3% dawki granicznej. Dawka 1 mSv jest dawką graniczną dla ogółu ludności, żaden pracownik placówki naukowo-badawczej nie przekroczył tej wartości.

Wykazany praktyczny brak zagrożenia radiologicznego w tej grupie pracowników wynika z właściwego stanu ochrony radiologicznej osób zawodowo narażonych.

Decydując się na wdrożenie technik radioizotopowych należy spełnić szereg warunków określonych w prawie atomowym [9]. Działalność związaną z narażeniem na promieniowanie jonizujące można prowadzić na podstawie zgłoszenia lub zezwolenia. Podstawa prawna, na jakiej prowadzona jest działalność, zależy od rodzaju wykorzystywanych izotopów i ich łącznej radioaktywności.

Działalność na podstawie zgłoszenia nie wymaga uruchomienia pracowni izotopowej, narażenie na promieniowanie jest znikome, a przy wysokiej czułości obecnie stosowanej aparatury ograniczenia radioaktywności nie stanowią bariery dla wielu programów badawczych. Szczegółowe zapisy prawne zawiera Rozporządzenie Rady Ministrów z dnia 6 sierpnia 2002 roku w sprawie przypadków, w których działalność związana z narażeniem na promieniowanie jonizujące nie podlega obowiązkowi uzyskania zezwolenia albo zgłoszenia, oraz przypadków, w których może być wykonywana na podstawie zgłoszenia [10].

Jeżeli planowana działalność wymaga zezwolenia, na wstępie należy ustalić wymagania techniczne i ochrony radiologicznej, które zależą od rodzaju źródeł promieniowania, przeznaczenia pracowni i stopnia zagrożenia. Pracownie lokalizuje się w budynkach o określonej klasie odporności ogniowej oraz odpowiednio zabezpieczonych przed zalaniem [11].

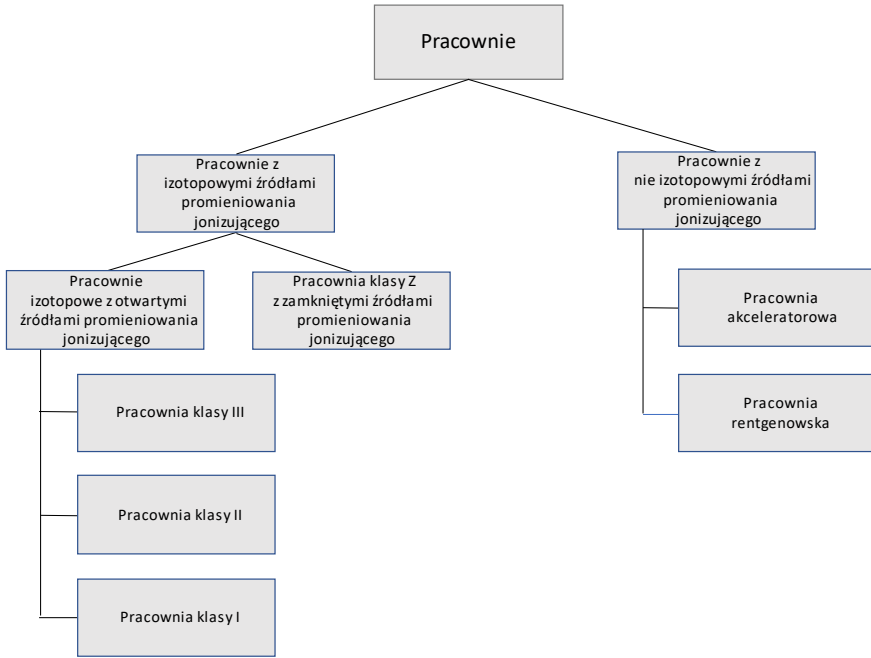
Wyróżniamy dwa rodzaje izotopowych źródeł promieniowania: źródła zamknięte i źródła otwarte. Źródło zamknięte to substancja promieniotwórcza, która jest szczelnie zamknięta w wytrzymałej obudowie zapobiegającej jej rozproszeniu. **Źródłem otwartym** nazywamy substancję promieniotwórczą o dowolnym składzie chemicznym, znajdującą się w dowolnym stanie skupienia, która ze względu na właściwości fizyczne i chemiczne może być wykorzystywana w różnych procedurach chemicznych i biomedycznych. Praca z otwartymi źródłami promieniowania może doprowadzić do rozproszenia substancji promieniotwórczej i spowodować skażenie promieniotwórcze.

W narażeniu na promieniowanie jonizujące możemy rozróżnić narażenie zewnętrzne – pochodzące od akceleratorów, aparatów rentgenowskich i izotopowych źródeł promieniowania oraz narażenie wewnętrzne – pochodzące od wchłoniętych przez organizm otwartych źródeł promieniowania.

Wyróżniamy trzy klasy pracowni izotopowych z otwartymi źródłami promieniowania, kryterium podziału jest aktywność stosowanych jednocześnie izotopów promieniotwórczych oraz ich przynależność do grup izotopów. Szczegółowe wymagania dotyczące organizacji pracowni izotopowych zawiera Rozporządzenie Rady Ministrów z dnia 12 lipca 2006 roku w sprawie szczegółowych warunków bezpiecznej pracy ze źródłami promieniowania jonizującego [11]. Wykaz dokumentów wymaganych do uruchomienia działalności związanej z narażeniem na promieniowanie jonizujące znajduje się na stronie internetowej Państwowej Agencji Atomistyki.

#### **4. Przykłady zastosowania radioizotopów**

Zastosowania promieniowania jonizującego i materiałów promieniotwórczych możemy rozpatrywać w kilku kategoriach: napromieniowanie różnych materiałów w celu uzyskania określonych zmian chemicznych lub fizycznych, stosowanie znaczników radioizotopowych, mierzenie radioaktywności pozwalające np. datować.



Rysunek 1. Podział pracowni, w których występuje narażenie na promieniowanie jonizujące

#### 4.1. Radioizotopy w medycynie

Medycyna nuklearna jako odrębna dyscyplina zrodziła się w latach 70. ubiegłego stulecia i jest oparta na zastosowaniu izotopów promieniotwórczych w diagnostyce oraz terapii. Wykorzystuje ona źródła promieniowania jonizującego w sposób bezpośredni lub w postaci związków chemicznych znakowanych radioizotopami. W zależności od sytuacji są to źródła otwarte lub zamknięte promieniowania jonizującego.

Zidentyfikowano szereg substancji chemicznych, które są wchłaniane przez określone narządy, radiofarmaceuci są w stanie przyłączać różne radioizotopy do substancji biologicznie czynnych. Paleta radioizotopów stosowanych w medycynie nuklearnej jest bardzo obszerna i zależy od specyficznego ich zastosowania.

Diagnostyczne radiofarmaceutyki mogą być stosowane między innymi do badania przepływu krwi do mózgu, funkcjonowania wątroby, płuc, serca lub nerek, oceny wzrostu kości oraz potwierdzenia innych procedur diagnostycznych [12]. Najczęściej stosowanym radioizotopem w medycynie jest Tc-99, stosowany jest on w około 80 procentach wszystkich procedur medycyny nuklearnej. Izotop ten ma prawie idealne właściwości do przeprowadzania obrazowania.

Należą do nich:

- okres półtrwania wynosi sześć godzin, co oznacza, że jest wystarczająco długi, aby zbadać procesy metaboliczne, a równocześnie wystarczająco krótki, aby zminimalizować dawkę promieniowania dla pacjenta;
- rozpada się w procesie, w którym emitowane są promienie gamma i elektrony o niskiej energii – zapewnia to, że dawka promieniowania dla pacjenta jest niska;
- emitowane niskoenergetyczne promienie gamma z łatwością przenikają ludzkie ciało, a następnie są wykrywane przez detektory;

- właściwości chemiczne technetu są tak wszechstronne, że może tworzyć znaczniki poprzez łączenie się z szeregiem substancji biologicznie czynnych, które zapewniają jego koncentrację w tkance lub narządzie będącym przedmiotem zainteresowania.

Radioizotop Tc-99 jest produktem rozpadu izotopu Mo-99 o okresie półtrwania 66 godzin, przemiana ta zachodzi w generatorze technetu, niewielkim urządzeniu, którego obsługa sprowadza się do wypukliwania technetu solą fizjologiczną [12].

Obrazowania diagnostyczne z zastosowanym technik radioizotopowych to głównie tomografie SPECT oraz PET.

W obrazowaniu SPECT promieniowanie mierzone jest przez kamery gamma, na detektor nakłada się kolimator blokujący wiązki promieniowania docierające pod kątem innym niż prosty. Aby powstał trójwymiarowy obraz detektor wykonuje ruch obrotowy. Wykonywanych jest wiele ujęć, złożenie ich pozwala na stworzenie trójwymiarowego obrazu. Tę technikę wykorzystuje się głównie do obrazowania mięśnia sercowego, mózgu, nerek, kości, ale także płuc i jelita grubego. Najczęściej stosowanymi izotopami są: Tc-99, In-111 oraz gal-67 [13].

W tomografii PET pacjentowi podaje się radioizotop o krótkim czasie połowicznego rozpadu, ulegający rozpadowi beta plus. Powstałe w ten sposób pozytony oddziałują z elektronami pochodzącymi z tkanek i ulegają anihilacji. Podczas tego procesu powstają dwa fotony poruszające się w przeciwnych kierunkach, które są następnie rejestrowane przez detektory umieszczone w pierścieniu dookoła ciała pacjenta. Pozwala to na dokładne ustalenie miejsca rozpadu, a następnie utworzenie pełnego obrazu.

W obrazowaniu PET najczęściej stosowanym radiofarmaceutyką jest fluoro-deoksyglukoza (FDG) zawierająca F-18 (okres półtrwania niecałe dwie godziny) jako znacznik FDG, jest łatwo włączana do komórek, i nie ulega rozkładowi i jest dobrym wskaźnikiem metabolizmu komórkowego [12].

Tomografie PET i SPECT różnią pod względem czułości i rozdzielczości, obrazowanie PET charakteryzuje się znacznie wyższą czułością (około dwadzieścia razy) [14].

Radioterapia jest szeroko rozpowszechnioną metodą niszczenia lub osłabienia nieprawidłowo funkcjonujących komórek za pomocą promieniowania. W większości przypadków wykorzystywane jest do tego promieniowanie beta. W radioterapii stosuje się głównie Lu-177 i Y-90; ten ostatni jest stosowany między innymi w leczeniu chłoniaka nieziarnicznego, raka wątroby i zapalenia stawów. W terapii stosuje się również jod-131, samar-153 i fosfor-32. Izotop I-131 jest stosowany w leczeniu raka i nadczynności tarczycy. Brachyterapia, czyli radioterapia bliskiego zasięgu, polega na bezpośrednim napromienianiu zmian chorobowych przez umieszczenie źródła promieniowania w guzie lub jego sąsiedztwie. W brachyterapii wykorzystuje się między innymi cez-131, pallad-103 i rad-223 [12].

Medycyna nuklearna wykorzystywana jest również w leczeniu paliatywnym w celu zmniejszenia bólu odczuwanego przez chorego. W tym przypadku najczęściej wykorzystuje się radioaktywny fosfor-32 w postaci ortofosforanu i radioaktywny stront-89 w formie chlorku. Efekt tej terapii utrzymuje się przez wiele miesięcy, również przy odstawieniu leków przeciwbólowych [15].

## **4.2. Radioizotopy w biochemii i biologii molekularnej**

W biochemii i biologii molekularnej często wykorzystuje się znaczniki promieniotwórcze. Są to między innymi: fosfor-32, tryt-3, siarka-35, węgiel-14 oraz wapń-45. Najczęściej są one stosowane w badaniach nad pierwotnym i wtórnym metabolizmem,

ekspresją genów (translacja, transkrypcja), potranslacyjnymi modyfikacjami białek, metabolizmem leków, jak również transportem metali przez membrany biologiczne [16].

Wprowadzenie radioizotopu fosforu do organizmu zwierzęcia (odpowiednie przygotowanie pokarmu) pozwala na śledzenie migracji fosforu poprzez pomiary emitowanego promieniowania. W podobny sposób można również śledzić rolę i szlaki metaboliczne mikroelementów w organizmach [17, 18].

Fosfor promieniotwórczy jest również wykorzystywany w biologii molekularnej. Początkowo był stosowany do określania sekwencji DNA. Obecnie służy on do identyfikacji miejsca fosforylacji białek, którym jest zazwyczaj seryna i/lub treonina [16].

Radioizotop siarki-35 jest wykorzystywany do identyfikacji miejsca sulfatacji białek. Izotop Ca-45 jest niezbędny w określeniu zdolności wiązania wapnia przez badane białka, ponieważ to jego kompleksy z białkami są później oznaczane ilościowo [16].

### 4.3. Radioizotopy w immunologii

Niestabilne nuklidy są między innymi stosowane w metodzie radioimmunologicznej RIA (ang. *Radio Immuno Assay*). Służy ona do ilościowego oznaczania hormonów, antygenów nowotworowych, swoistych przeciwciał IgE, leków, witamin oraz innych związków chemicznych. Do znakowania wykorzystuje się najczęściej jod-125, węgiel-14 lub tryt-3. RIA została opracowana przez Rosalyn Yalow, która w 1977 roku została nagrodzona Nagrodą Nobla za swoje odkrycie [16]. W ostatnich latach, ze względu na trudności związane z pracą z wykorzystaniem radioizotopów, metoda RIA jest coraz częściej zastępowana metodą ELISA.

### 4.4. Radioizotopy w paleontologii

Najczęściej stosowaną metodą w określaniu wieku różnych materiałów jest datowanie radioizotopowe. Spośród kilku odmian tej metody najczęściej przeprowadzane jest datowanie radiowęglowe. Datowanie radiowęglowe to metoda pozwalająca na określenie wieku próbek powstałych do 50 tysięcy lat temu. Bazuje ona na ustaleniu proporcji pomiędzy radioizotopem węgla-14 a izotopem trwałym węgla-12.

Izotop promieniotwórczy węgla powstaje w górnych częściach atmosfery, następnie radioaktywny dwutlenek węgla zostaje wbudowany do organizmów żywych, w ten sposób ustala się równowaga pomiędzy ilością atomów węgla-14 i węgla-12 w środowisku i w organizmach żywych.

W momencie śmierci organizmu ustaje pobieranie radioizotopu węgla ze środowiska, a węgiel-14, dotychczas pochłonięty, ulega rozpadowi. Na podstawie stosunku zawartości izotopu węgla-14 do zawartości węgla stabilnego można oszacować, kiedy nastąpiło wbudowanie izotopu promieniotwórczego, czyli jaki jest wiek badanego materiału. Metodą datowania radiowęglowego można określić wiek z dokładnością  $\pm 40$  lat [19].

### 4.5. Radioizotopy w energetyce i przemyśle

Energia uwalniana w trakcie przemian jądrowych wykorzystywana jest zarówno w skali makro: elektrownie jądrowe, napęd okrętów podwodnych (tutaj wykorzystywane są izotopy U-235 i Pu-239), jak i w skali mikro, na przykład napęd sond kosmicznych realizowany z wykorzystaniem radioizotopowych generatorów termoelektrycznych (tutaj najczęściej wykorzystywany jest izotop Pu-238).

W przemyśle powszechnie wykorzystuje się grubościomierze działające na zasadzie absorpcji i rozpraszania promieniowania gamma i beta, są to urządzenia pomiarowe o wysokiej niezawodności i dokładności. Najczęściej stosowanymi w grubościomierzach źródłami promieniowania beta są: Sr-90/Y-90, Kr-85, Ru-106/Rh-106, Pm-147 i Tl-204. W grubościomierzach, w których wykorzystuje się absorpcję promieniowania gamma źródłami promieniowania najczęściej są: Co-60, Cs-137 i Am-241.

Izotopowe poziomomierze są szeroko wykorzystywane w przyrządach służących do pomiaru poziomu cieczy i ciał sypkich w różnego rodzaju zbiornikach. Są również stosowane do wyznaczania granicy pomiędzy frakcją stałą i ciekłą, a nawet pomiędzy frakcjami o różnych gęstościach. Najczęściej stosowanymi tutaj źródłami są Co-60 i Cs-137.

Analizatory składu, w których wykorzystuje się spektrometryczny detektor promieniowania stosuje się między innymi do pomiaru zawartości popiołu w węglu. Wykorzystuje się w nich źródła promieniowania gamma, którymi najczęściej są: Am-241 i Cs-137 [20].

## 5. Wnioski

Stosowanie technik radioizotopowych jest całkowicie bezpieczne pod warunkiem przestrzegania elementarnych zasad bezpieczeństwa zawartych w uregulowaniach prawnych, z uwagi na wysoką ich czułość i szerokie zastosowanie podejmowanie prac eksperymentalnych z ich zastosowaniem w zakresie nauk biomedycznych jest w pełni uzasadnione.

## Literatura

1. Moskal P., Jowzae S., *Promieniowanie naturalne z Ziemi i z Kosmosu*, Foton, 117, 2012.
2. *Roczny raport. Działalność Prezesa Państwowej Agencji Atomistyki oraz ocena stanu bezpieczeństwa jądrowego i ochrony radiologicznej w Polsce w 2015 roku*, Państwowa Agencja Atomistyki, Warszawa 2016.
3. Rosik-Dulewska C., Nocoń K., Karwaczyńska U., *Wytwarzanie granulatu z komunalnych osadów ściekowych i popiołów lotnych w celu ich przyrodniczego (nawozowego) odzysku*, Instytut Podstaw Inżynierii Środowiska Polskiej Akademii Nauk, Zabrze 2016.
4. López M., Martín M., *Medical management of the acute radiation syndrome*, Reports of Practical Oncology & Radiotherapy, 16(4), 2011, s. 138-146.
5. *Roczny raport. Działalność Prezesa Państwowej Agencji Atomistyki oraz ocena stanu bezpieczeństwa jądrowego i ochrony radiologicznej w Polsce w 2020 roku*, Państwowa Agencja Atomistyki, Warszawa 2021.
6. Rozporządzenie Rady Ministrów z dnia 18 stycznia 2005 r. w sprawie dawek granicznych promieniowania jonizującego, Dz. U. z 2005 r. Nr 20, poz. 168, Prawo atomowe.
7. Bailey S., *Aircrew radiation exposure – an overview*, Nuclear News, January 2000.
8. Papier S., Kacprzyk J., Kamiński Z., Adamowicz M., Zmyślony M., *Ocena narażenia zawodowego na promieniowanie rentgenowskie i gamma w Polsce w roku 2010*, Medycyna Pracy, 62(6), 2011, s. 579-582.
9. Ustawa z dnia 29 listopada 2000 r., Prawo atomowe, tekst jednolity: Dz. U. z 2007 r. Nr 42, poz. 276 z późn. zm.
10. Rozporządzenie Rady Ministrów z dnia 6 sierpnia 2002 r. w sprawie przypadków, w których działalność związana z narażeniem na promieniowanie jonizujące nie podlega obowiązkowi uzyskania zezwolenia albo zgłoszenia, oraz przypadków, w których może być wykonywana na podstawie zgłoszenia, Dz. U. z 2002 r. Nr 137, poz. 1153.

11. Rozporządzenie Rady Ministrów z dnia 12 lipca 2006 r. w sprawie szczegółowych warunków bezpiecznej pracy ze źródłami promieniowania jonizującego, Dz. U. z 2006 r. Nr 994.
12. <https://world-nuclear.org/information-library/non-power-nuclear-applications/radioisotopes-research/radioisotopes-in-medicine.aspx>.
13. Bhattacharyya S., Dixit M., *Metallic radionuclides in the development of diagnostic and therapeutic radiopharmaceuticals*, Dalton Trans, 40(23), 2011, s. 6112-6128.
14. Arman R., Habib Z., *PET versus SPECT: strengths, limitations and challenges*, Nuclear Medicine Communications, 29(3), 2008, s. 193-207.
15. Markowska J., Mądry R., *Terapie wspomagające w nowotworach złośliwych*, Wrocław 2011.
16. Szewczuk-Karpisz K., *Zastosowanie radioizotopów w naukach biologicznych*, Nauki Przyrodnicze, 1(7), 2015, s. 35-41.
17. Kawachi M., Nagasaki-Takeuchi N., Kato M., Maeshima M., *Radioisotopes – applications in bio-medical science*, Metal Binding Proteins and Metal, 2011, s. 115-126.
18. Witten V.H., Brauer E.W., Loevinger R., Holmstrom V., *Studies of radioactive phosphorus applied to human skin*, The Journal of Investigative Dermatology, 26, 1956, s. 437-447.
19. Walanus A., Kokowski M., *Możliwość wykorzystania radiowęglowej metody datowania w badaniach grobu Mikołaja Kopernika. Tajemnica Grobu Mikołaja Kopernika*, Dialog Ekspertów, Kraków 22-23.02.2010.
20. Urbański P., *Zastosowania radioizotopowej aparatury przemysłowej w kraju i na świecie*, Raporty IChTJ. Seria B, 4, 2001, Warszawa 2001.

## **Narażenie na promieniowanie jonizujące i ochrona radiologiczna w badaniach naukowych**

### Streszczenie

Niniejsza praca skierowana jest do pracowników nauki, którzy dotychczas nie wykorzystywali technik radioizotopowych w swoich badaniach. Rzadkie wykorzystywanie tych technik często wynika z obawy przed zagrożeniem związanym z promieniowaniem jonizującym. Pokazanie, że średnie dawki promieniowania jonizującego otrzymywane przez osoby zawodowo narażone na promieniowanie porównywalne są z dawkami uzyskiwanymi od źródeł naturalnych może skorygować wyobrażenie o zagrożeniu. Poznanie podstawowych pojęć z zakresu promieniotwórczości, regulacji prawnych i przykładów wykorzystania technik radioizotopowych może zainspirować do wykorzystania tych technik w badaniach własnych.

Słowa kluczowe: radioizotopy, promieniowanie naturalne, dawki promieniowania, prawo atomowe, techniki radioizotopowe

## **Exposure to ionizing radiation and radiological protection in scientific research**

### Abstract

This paper is aimed at scientists who have not used radioisotope techniques in their research so far. The infrequent use of these techniques is often due to fear of the dangers of ionizing radiation. Showing that the average doses of ionizing radiation received by people professionally exposed to radiation are comparable to the doses obtained from natural sources may correct the perception of the threat. Getting to know the basic concepts of radioactivity, legal regulations and examples of the use of radioisotope techniques may inspire the use of these techniques in own research.

Keywords: radioisotopes, natural radiation, radiation doses, atomic law, radioisotope techniques



## Indeks Autorów

Benke G. ....	157
Bogacz A. ....	168
Chmielewska S. ....	61
Czyżewska U. ....	61
Gałużka A. ....	31
Gdowska J. ....	51
Gębczyńska S. ....	51
Goc K. ....	157
Janeczko M. ....	40
Juan C. ....	7
Kiełczewska K. ....	7
Klimczak U. ....	140
Konieczna-Molenda A. ....	78
Kurhaluk N. ....	87
Leszczyńska-Sejda K. ....	157
Ludwicki W. ....	31
Malarz J. ....	157
Małkusz E. ....	51
Mañes J. ....	7
Mroczek A. ....	140
Nalepa B. ....	7
Orlicki A. ....	126
Pianowska K. ....	157
Pietrzak-Fiećko R. ....	7
Rył B. ....	51
Stefanowski N. ....	87
Tkachenko H. ....	87
Tylicki A. ....	61
Zapała W. ....	112
Zdybel M. ....	126
Ziobrowski P. ....	112