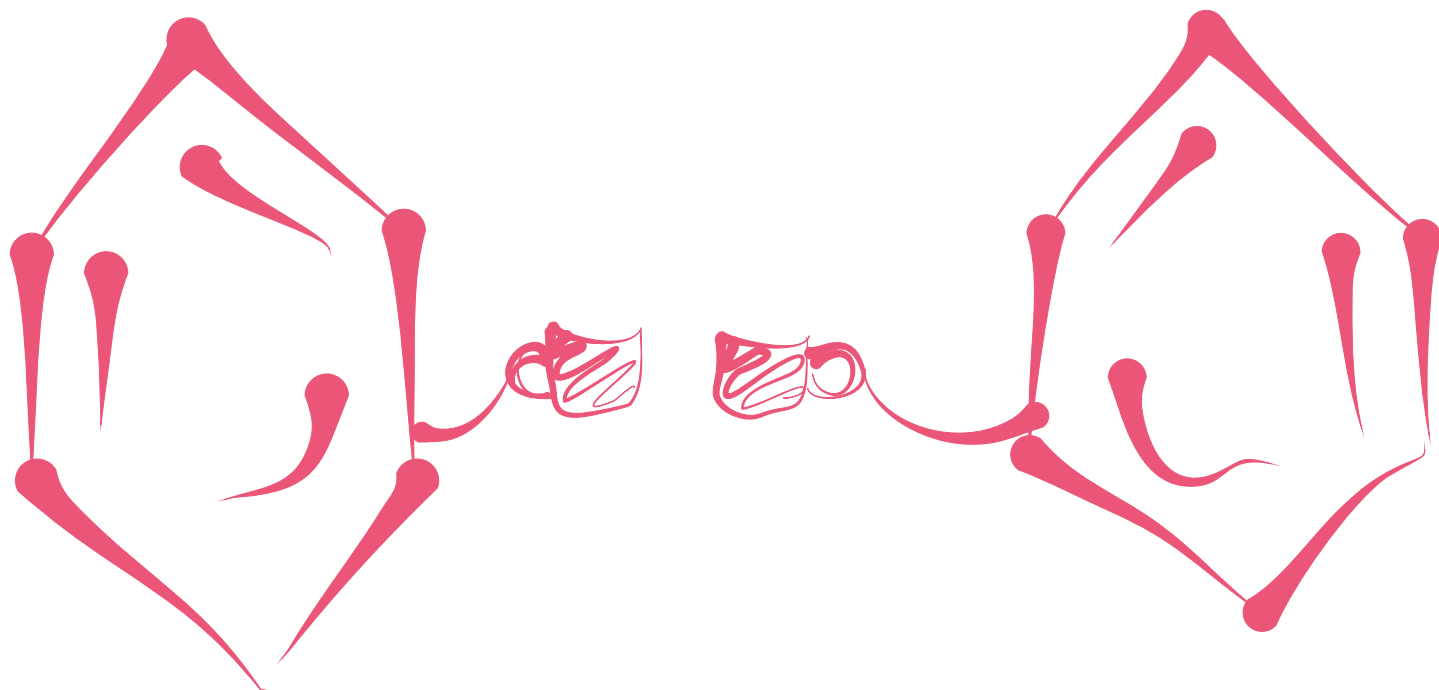




SEKCJA STUDENCKA
POLSKIEGO TOWARZYSTWA CHEMICZNEGO



„KWADRANS DLA CHEMII”

MONOGRAFIA

ZJAZD WIOSENNY
SEKCJI STUDENCKIEJ
POLSKIEGO TOWARZYSTWA CHEMICZNEGO

05-09.04.2017 r.
STEGNA



OFICyna
EDUKACYJNA

KRZYSZTOF PAZDRO



**OFICyna
EDUKACYJNA**

KRZYSZTOF PAZDRO



www.pazdro.com.pl

**„KWADRANS DLA CHEMII”
MONOGRAFIA
ZJAZDU WIOSENNEGO
SEKCJI STUDENCKIEJ
POLSKIEGO TOWARZYSTWA
CHEMICZNEGO**

Stegna, 05-09 kwietnia 2017

Recenzenci:

prof. dr hab. Jędrzej Antosiewicz (Gdański Uniwersytet Medyczny)
prof. dr hab. Piotr Kuśtrowski (Uniwersytet Jagielloński)
prof. dr hab. inż. Tadeusz Ossowski (Uniwersytet Gdański)
prof. dr hab. inż. Zygfryd Witkiewicz (Wojskowa Akademia Techniczna)
prof. dr hab. inż. Adam Voelkel (Politechnika Poznańska)
prof. dr hab. Michał Żmijewski (Gdański Uniwersytet Medyczny)
dr hab. Witold Gładkowski (Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu)
dr hab. Małgorzata Grabarczyk (Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu)
dr hab. Wojciech Kamysz (Gdański Uniwersytet Medyczny)
dr hab. Karol Krzymiński, prof. UG (Uniwersytet Gdański)
dr hab. Elżbieta Jankowska (Uniwersytet Gdański)
dr hab. Ewa Witek (Uniwersytet Jagielloński)

Wszystkie opublikowane artykuły zostały pozytywnie zrecenzowane

© Copyright by Sekcja Studencka PTChem

ISBN 978-83-7594-156-2

Wydawca:



Oficyna Edukacyjna * Krzysztof Pazdro Sp. z o.o.

Redakcja i skład:

mgr Anna Fajkiel

mgr Piotr Stasiewicz

lic. Tomasz Kostrzewa

**Niniejsze artykuły zostały opublikowane na podstawie materiałów
nadesłanych przez uczestników Zjazdu Wiosennego SSPTChem 2016.
SSPTChem nie ponosi odpowiedzialności za ich treść.**

Komitet Organizacyjny

Tomasz Kostrzewa – Przewodniczący Komitetu Organizacyjnego	
inż. Hanna Makowska – Przewodnicząca Sekcji Studenckiej PTChem	
mgr inż. Paulina Filipczak	
Gabriela Handzlik	
Przemysław Piątek	
mgr Justyna Piechocka	
mgr Piotr Stasiewicz	
mgr inż. Anna Stefaniuk-Grams	Doradca Sekcji Studenckiej PTChem
dr hab. Jacek Lipok, prof. UO	Opiekun Sekcji Studenckiej PTChem

Spis treści

Wstęp	5
BADANIA SPEKTROSKOPOWE I STRUKTURALNE POCHODNYCH TERFENYLU DO ROLI FLUORESCENCYJNYCH SENSORÓW MOLEKULARNYCH	
<i>Nikola Fajkis, Mariusz Galek</i>	7
ZNACZENIE PROONKOGENNE FOSFATAZ TYROZYNOWYCH SHP2 ORAZ PTP1B W ROZWOJU RAKA PIERSI	
<i>Tomasz Kostrzewa, Alicja Kuban-Jankowska, Anna Kostrzewa-Itrych, Marcin Kawczyński, Zbigniew Maćkiewicz, Michał Woźniak</i>	16
CHROMATOGRAPHIC STUDY OF THE PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF [4-(4-TRANS-ETHYLCYCLOHEXANECARBONYL) OXYPHENYL] 4-(4-TRANS-PROPYLCYCLOHEXYL) BENZOATE	
<i>Justyna Jonik, Henryk Grajek, Marcin Purchała, Tomasz Wawer</i>	24
CHARAKTERYSTYKA, WYSTĘPOWANIE I ANALIZA STEROLI ROŚLINNYCH	
<i>Małgorzata Skarbek</i>	36
CLINICAL APPLICATIONS OF SILVER AND GOLD NANOPARTICLES. BENEFITS AND THREATS. A REVIEW.	
<i>Karol Steckiewicz, Ewelina Zielińska, Michał Woźniak, Iwona Inkielewicz-Stępnia</i>	48
ADIPOCERA I WONNE SUBSTANCJE LOTNE POWSTAJĄCE PODCZAS ROZKŁADU LUDZKIEGO CIAŁA ORAZ ORGANIZMY ZDOLNE DO ICH WYKRYWANIA	
<i>Tomasz Swebocki</i>	57
<i>Indeks autorów</i>	65

Wstęp

Jest nam niezmiernie miło, że do Państwa rąk trafiła już druga edycja monografii Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego wydana po Zjeździe Wiosennym SSPTChem, który odbył się dniami 05-09 kwietnia 2017 roku w Stegnie.

W Zjeździe wzięło udział 83 uczestników, z licznych ośrodków akademickich w Polsce, którzy wygłosili 24 komunikaty ustne oraz przedstawili 51 posterów. Podczas Zjazdu odbyły się wykłady plenarne, na których uczestnicy konferencji mieli szansę wysłuchać ciekawych prelekcji wybitnych polskich uczonych oraz wykładów młodych naukowców z uczelni zagranicznych.

Drugi raz uczestnicy zjazdu mieli możliwość opublikowania artykułów w monografii pokonferencyjnej. W niniejszej pozycji możemy znaleźć prace napisane na podstawie badań własnych, jak i typowe prace przeglądowe. Mamy nadzieję, że kolejny zjazd SSPTChem przyniesie wydanie kolejnej edycji monografii Sekcji Studenckiej Polskiego Towarzystwa Chemicznego.

Pragniemy podziękować Oficynie Edukacyjnej * Krzysztof Pazdro Sp. z o.o. za wydanie niniejszej pozycji. Liczymy na dalszą owocną współpracę z Państwa wydawnictwem.

Przyjemnej lektury życzy
Komitet Organizacyjny Zjazdu Wiosennego
Sekcji Studenckiej PTChem 2017

**BADANIA SPEKTROSKOPOWE I STRUKTURALNE POCHODNYCH TERFENYLU
DO ROLI FLUORESCENCYJNYCH SENSORÓW MOLEKULARNYCH**

**SPECTROSCOPIC AND STRUCTURAL STUDIES OF TERPHENYL DERIVATIVES
FOR THE ROLE OF FLUORESCENT MOLECULAR SENSORS**

Nikola Fajkis^{1,2}, Mariusz Galek²

¹Uniwersytet Jagielloński w Krakowie, Wydział Chemii
ul. Romana Ingardena 3, 30-060, Kraków

²Photo High Technologies
ul. Bobrzyńskiego 14, 30-348, Kraków
nikola.fajkis@gmail.com

Streszczenie

Innowacyjnym zastosowaniem pochodnych terfenylu jest synteza sond fluorescencyjnych, które dzięki swoim właściwościom stanowią podstawę techniki FPT (*Fluorescence Probe Technology*).¹ Sondy te, jako sensory molekularne, są czułe na zmianę lepkości oraz polarności otoczenia i za pomocą kwantów światła przenoszą tę informację do urządzenia pomiarowego. Wyżej opisana korelacja pozwala przede wszystkim na śledzenie szybkich procesów polimeryzacji.²

Celem niniejszej pracy była synteza pochodnych 2-metoksy-*o*-terfenylu oraz 2-metoksy-*m*-terfenylu, wstępne określenie ich użyteczności jako fluorescencyjnych sond molekularnych, a także badanie spektroskopowe i strukturalne otrzymanych związków. Pochodne uzyskano za pomocą reakcji Suzuki w wyniku sprzęgania 2,6-dibromoanizolu z odpowiednio podstawionymi kwasami fenyloboronowymi. Reakcję prowadzono w obecności węgla potasu oraz katalizatora - tetrakis(trifenylfosfina) pallad(0) w roztworze N,N-dimetyloformamidu z wodą przez 12 godzin, utrzymując temperaturę 90°C.

Abstract

One of the the innovate uses of terphenyl derivatives is a synthesis of fluorescent probes, which are the basis of the FPT (*Fluorescence Probe Technology*). Depending on the environment, these probes have the ability to change the fluorescence characteristics (photophysical and photochemical properties). Probes, as molecular sensors, are sensitive to change of viscosity and polarity of the environment.² They are capable of transmitting the information about the state of viscosity and polarity of the environment to a measuring device, via light quanta. The devices are capable of relaying information about the state of to a measuring device to the user. Described above correlation allows, first and foremost, the tracking of fast polymerisation processes.¹

The purpose of this work was to synthesize 2-methoxy-*o*-terphenyl and 2-methoxy-*m*-terphenyl derivatives, the initial determination of their efficiency as fluorescent molecular probes, and acquisition of spectroscopic and structural studies of these compounds. Derivatives were obtained by the Suzuki reaction, by coupling

¹ K. Sawicz, J. Ortyl, R. Popielarz, *Technical Transactions*, 2009, 3(69), 119-126.

² J. Ortyl, K. Sawicz, R. Popielarz, *Technical Transactions*, 2010, 10, 233-242.

Badania spektroskopowe i strukturalne pochodnych terfenylu do roli fluorescencyjnych sensorów molekularnych

2,6-dibromoanisole with appropriately substituted phenyl boronic acids. The reaction was carried out in the presence of potassium carbonate and a catalyst – tetrakis (triphenylphosphine) palladium(0) in dimethylformamide solution with water for 12 hours, at constant temperature of 90 ° C.

1. Wstęp

Terfenyle to związki węglowodorów aromatycznych, znane również jako difenylobenzeny oraz trifenyle. Ich struktury zawierają centralny pierścień benzenu podstawiony dwoma grupami fenyłowymi. Istnieją trzy izomery difenylobenzenu (orto, meta oraz para), których mieszanina jest wykorzystywana do produkcji polichlorowanych pochodnych terfenylu. Związki te były wykorzystywane przede wszystkim jako plastyfikatory, jednak ze względu na ochronę środowiska zaprzestano ich produkcji. Również same difenylobenzeny posiadają szerokie spektrum zastosowań. Są one wykorzystywane jako smary, płyny chłodzące, rozpuszczalniki barwników, chłodziwa w reaktorach atomowych, a także do produkcji polimerów (np. polichloru winylu).³

Nowym, potencjalnym zastosowaniem pochodnych terfenylu jest technologia sond fluorescencyjnych, która bazuje na zastosowaniu sensorów molekularnych podczas procesu polimeryzacji. W zależności od otaczającego środowiska, sondy te wykazują zdolność do zmiany charakterystyki fluorescencji (tj. właściwości fotofizycznych oraz fotochemicznych). Sondy, jako sensory molekularne, są czułe na zmianę lepkości oraz polarności otoczenia i w wyniku tego oddziaływania zmianom ulega widmo fluorescencji. Pozwala to między innymi na śledzenie szybkich procesów polimeryzacji.

W pierwszym etapie działania sondy molekularnej fluorofor pochłania kwanty światła. Ulega on wzbudzeniu, relaksacji oraz stabilizacji w wyniku oddziaływania ze środowiskiem. Wraz ze zmianą właściwości otoczenia obserwuje się również zmianę stopnia relaksacji. Różnice te są rejestrowane jako przesunięcie widma fluorescencji oraz zmianę intensywności maksimum emisji sondy podczas procesu polimeryzacji.

Przykładem zastosowania techniki sond fluorescencyjnych jest monitorowanie procesu sieciowania żywic epoksydowych przy użyciu różnorodnych utwardzaczy. Badania nad techniką FTP w przypadku sieciowania przestrzennego są szczególnie ważne, ponieważ dobierając typ utwardzacza oraz kontrolując parametry procesu utwardzania, możliwe jest modyfikowanie właściwości utwardzonego polimeru.¹

Porównano również wyznaczone parametry kinetyczne procesu polimeryzacji monitorowanego zarówno sondami molekularnymi, jak i metodą FT-IR oraz DSC. Potwierdzono, że FTP pozwala na wyznaczenie równie wiarygodnych parametrów kinetycznych co FT-IR i DSC.⁴ Technika sond molekularnych to zdecydowanie szybsza i łatwiejsza w wykonaniu metoda kontrolowania polimeryzacji.

¹ K. Sawicz, J. Ortyl, R. Popielarz, *Technical Transactions*, 2009, 3(69), 119-126.

³ K. Sitarek, *Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy*, 2011, 3(69), 171-188.

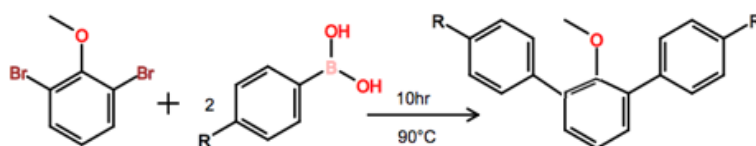
⁴ K. Sawicz-Kryniger, rozprawa doktorska, 2013.

2. Materiały i metody

Synteza potencjalnych sond molekularnych:

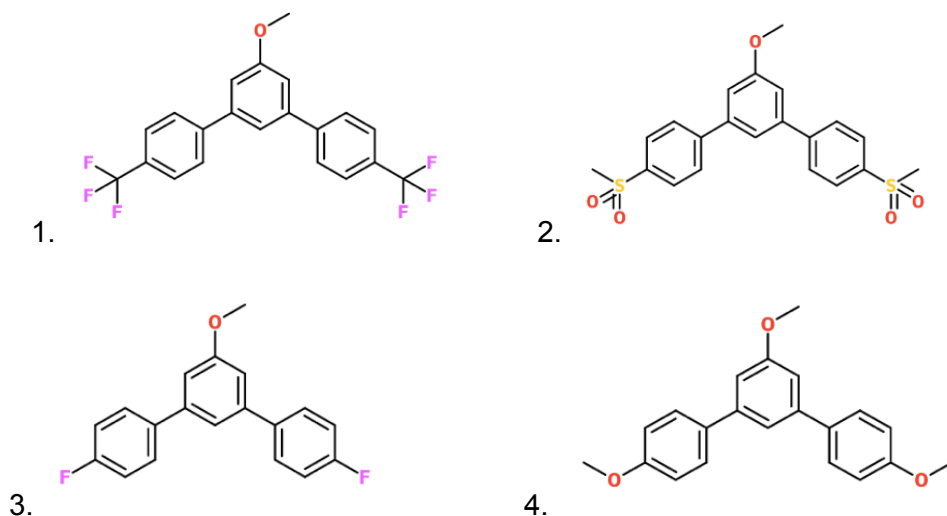
2,6-dibromoanizol (0,200 g; 1 eq), kwas 4-metoksyfenyloboronowy (0,288 g; 2,5 eq), tetrakis(trifenylofosfina) pallad(0) (0,053 g; 0,06 eq) oraz węglan potasu (0,314 g; 3 eq) zostały rozpuszczone w mieszaninie DMF i H₂O w stosunku objętościowym 10:1 (3 ml DMF + 0,3 ml H₂O). Mieszaninę reakcyjną barbotowano argonem. Reakcję prowadzono przez dziesięć godzin w reaktorze umieszczonym w łaźni olejowej na mieszadle magnetycznym wyposażonym w zintegrowany termostat elektroniczny w temperaturze 90°C. Produkt ekstrahowano z mieszaniny trzykrotnie za pomocą octanu etylu. Połączone fazy organiczne przemyto solanką. Pozostałości fazy wodnej, znajdujące się w fazie organicznej, suszono bezwodnym siarczanem(VI) sodu. Mieszaninę przefiltrowano, a rozpuszczalnik odparowano. Produkt oczyszczono za pomocą gradientowej chromatografii kolumnowej (heksan 100% -> heksan:octan etylu 1:1).

Schemat sprzęgania przedstawiono poniżej.

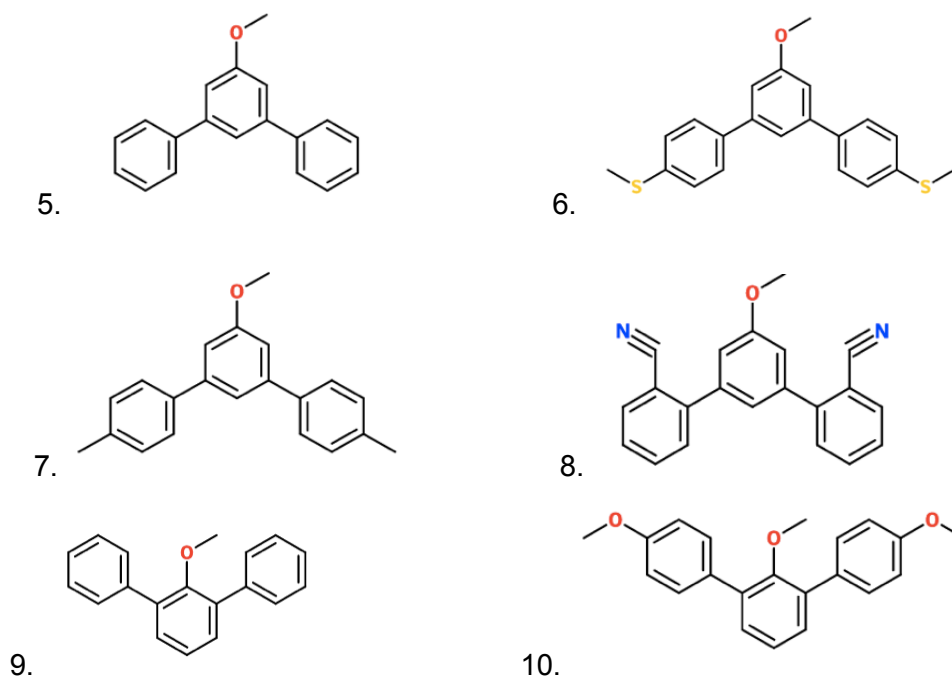


Schemat 1. Schemat sprzęgania 2,6-dibromoanizolu oraz odpowiednio podstawionych kwasów fenylboronowych.

Pozostałe pochodne otrzymano stosując procedurę opisaną powyżej. Struktury wszystkich otrzymanych związków zostały potwierdzone badaniami ¹H NMR oraz ¹³C NMR. Na Rys. 1. pokazano wzory strukturalne wszystkich zsyntetyzowanych pochodnych terfenylu.



Badania spektroskopowe i strukturalne pochodnych terfenylu do roli fluorescencyjnych sensorów molekularnych



Rysunek 1. Otrzymane pochodne terfenylu.

Aparatura:

W skład fluorymetru wykorzystanego do badań wchodziły: dioda UV LED emitująca światło o długości fali 320 nm, detektor CCD (StellarNet, USA) oraz światłowody. Fluorymetr był również zaopatrzony w komorę do badań kinetycznych.

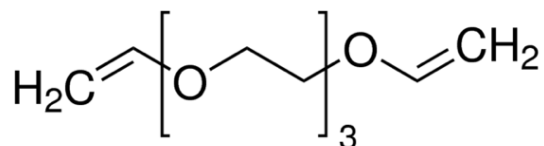
Badania spektroskopowe i strukturalne:

Struktury wszystkich pochodnych zostały potwierdzone badaniem ^1H NMR i ^{13}C NMR. Przed rozpoczęciem reakcji polimeryzacji zmierzono widma absorpcyjne i fluorescencyjne otrzymanych pochodnych terfenylu. W tym celu sporządzono roztwory potencjalnych sond molekularnych o stężeniu $1\text{ mg}/50\text{ cm}^3$ rozpuszczonych w acetonitrylu (Sigma Aldrich) i umieszczono je w kuwetach kwarcowych. Badania prowadzono w temperaturze pokojowej.

Badania kinetyki polimeryzacji:

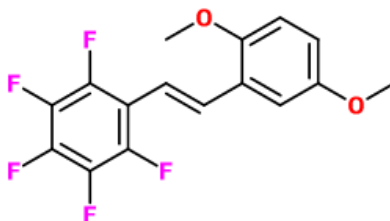
W celu zmierzenia kinetyki reakcji fotopolimeryzacji przygotowano roztwór zawierający: monomer (TEGDVE; 1 g), inicjator (HIP; 10 mg) oraz potencjalną, fluorescencyjną sondę molekularną (pochodna terfenylu; 1 mg). Wszystkie kompozycje chroniono przed działaniem światła.

Badania spektroskopowe i strukturalne pochodnych terfenylu do roli fluorescencyjnych sensorów molekularnych



Rysunek 2. Częsteczka monomeru - TEGDVE.

Przygotowano również próbkę referencyjną zawierającą zsyntetyzowaną sondę standardową o wzorze strukturalnym pokazanym na Rys.3.

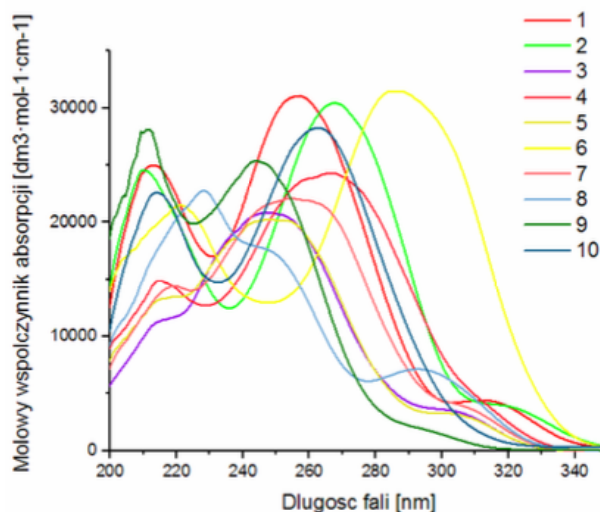


Rysunek 3. Częsteczka sondy referencyjnej.

Niektóre sondy molekularne wraz z inicjatorem od razu rozpuściły się w monomerze. Pozostałe mieszaniny umieszczono w łaźni ultradźwiękowej, na możliwie najkrótszy okres czasu. Kroplę kompozycji umieszczano pomiędzy dwoma szkiełkami mikroskopowymi, które dzięki przekładkom dystansowym i ściskaczom były oddzielone od siebie na odległość 0,1 mm. Przygotowany układ umieszczano na głowicy pomiarowej i natychmiast uruchamiano zapis widm fluorescencyjnych. Badania prowadzono w temperaturze pokojowej.

3. Wyniki i wnioski

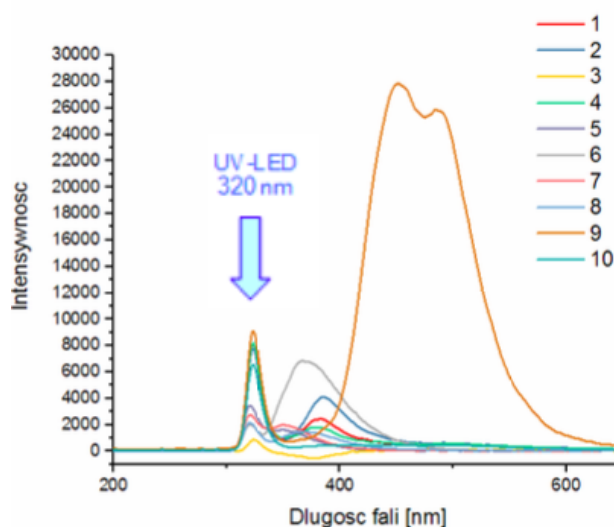
Zmierzono widma absorpcyjne poszczególnych pochodnych terfenylu (Rys.4.). Ze względu na różne stężenia molowe badanych roztworów potencjalnych sond molekularnych, intensywność została przeliczona na molowy współczynnik absorpcji.



Rysunek 4. Widma absorpcji dla poszczególnych związków. Oznaczenia zgodne z Rysunkiem 1.

Badania spektroskopowe i strukturalne pochodnych terfenylu do roli fluorescencyjnych sensorów molekularnych

Zmierzono widma emisyjne otrzymanych pochodnych terfenylu (Rys.5.). Szczególnie intensywne widma można przypisać związkom numer 9, 6 oraz 2 (pochodna niepodstawiona, a także pochodne podstawione kolejno grupą metylotiolową oraz metylosulfonową). Najmniejszą intensywność przy badanej długości fali (320 nm) wykazywała pochodna numer 3 (pochodna podstawiona dwoma atomami fluoru).



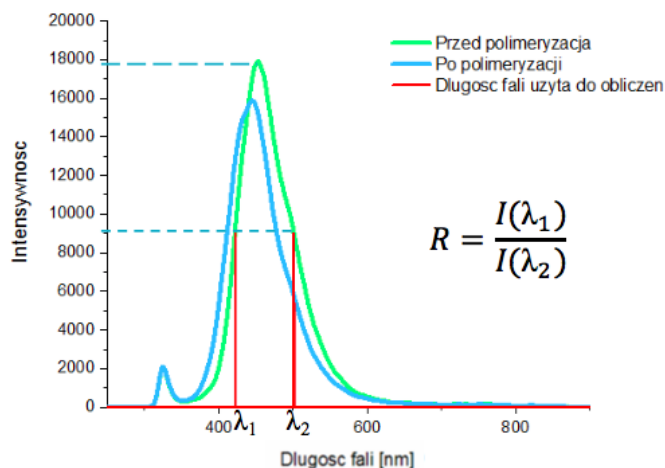
Rysunek 5. Widma emisyjne dla poszczególnych związków. Oznaczenia zgodne z Rysunkiem 1.

Proces fotopolimeryzacji monitorowano w oparciu o wyznaczoną z widm wartość współczynnika R , zdefiniowanego jako stosunek intensywności fluorescencji przy dwóch różnych długościach fali, które zostały wybrane zgodnie z regułą opisaną poniżej. Wyznaczone długości fali były zlokalizowane po obu stronach maksimum fluorescencji. Odpowiadały one również połowie maksymalnej intensywności fluorescencji przed poliaddycją.

$$R = \frac{I(\lambda_1)}{I(\lambda_2)}$$

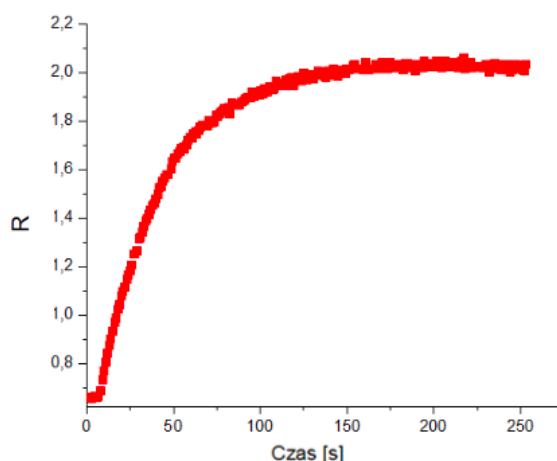
Poniżej przedstawiono widmo fluorescencji zmierzonej przed i po fotopolimeryzacji przy zastosowaniu sondy referencyjnej. Obserwowano spadek intensywności fluorescencji oraz przesunięcie maksimum w stronę niższych długości fali. Dzięki temu związek ten może być potencjalnie zastosowany jako fluorescencyjna sonda molekularna.

Badania spektroskopowe i strukturalne pochodnych terfenylu do roli fluorescencyjnych sensorów molekularnych



Rysunek 6. Widma fluorescencji zmierzonej przed i po polimeryzacji przy zastosowaniu wzorca jako sondy referencyjnej.

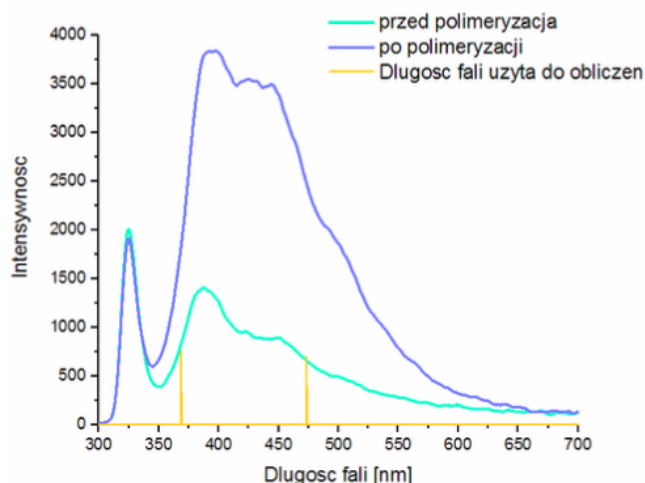
Na Rys.7. przedstawiono zależność parametru R od czasu przebiegu fotopolimeryzacji. Początkowo wyznaczona krzywa intensywnie wzrasta, aż do osiągnięcia plateau (150 s). Taki przebieg procesu kinetycznego wskazuje na możliwość zastosowania związku referencyjnego jako sondy molekularnej.



Rysunek 7. Wykres stosunku intensywności fluorescencji przy zastosowaniu związku referencyjnego jako sondy.

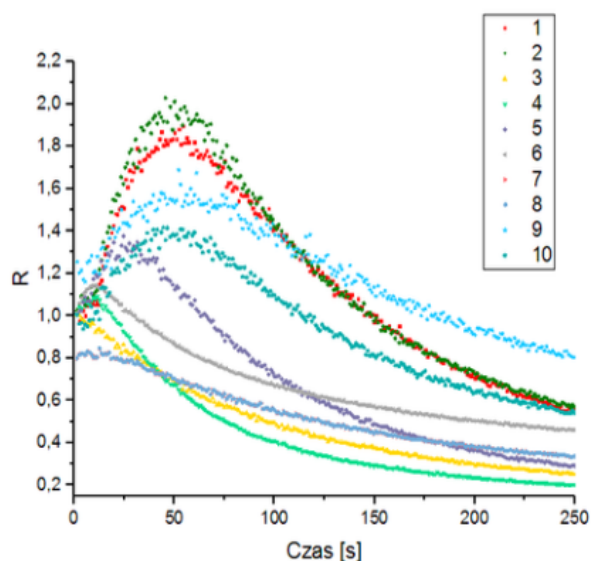
Zmierzono widma fluorescencyjne przed i po procesie fotopolimeryzacji dla otrzymanych pochodnych terfenylu (Rys.8.). Możemy zaobserwować duży wzrost intensywności fluorescencji. Maksimum intensywności nie uległo przesunięciu, co wskazuje na nieprzydatność tego typu pochodnych w technice fluorescencyjnych sond molekularnych.

Badania spektroskopowe i strukturalne pochodnych terfenylu do roli fluorescencyjnych sensorów molekularnych



Rysunek 8. Przykład widma fluorescencyjnego zmierzonego przed i po polimeryzacji z zastosowaniem odpowiedniej pochodnej.

Zgodnie z opisaną procedurą wyznaczono krzywe kinetyczne dla wszystkich zsyntezowanych pochodnych terfenylu. Na podstawie ich kształtu stwierdzono, że nie nadają się one do pełnienia roli sensorów molekularnych. Nie pozwalają one na śledzenie zmian zachodzących w układzie w oparciu o wyznaczoną wartość R . Można zauważyć, że początkowo sondy molekularne reagują na zachodzące zmiany, co jest zobrazowane wzrostem wartości R . Najbardziej obiecujące wyniki uzyskano dla związków 2,1,9,10 (pochodne terfenylu podstawione kolejno grupami: metylosulfonową, trifluorową, brakiem podstawnika oraz metoksyłową). Dodatkowo w związkach 1 i 2 (pochodne podstawione grupą trifluorową oraz metylosulfonową) obserwuje się strome nachylenie krzywej obrazującej zależność R od czasu, co zwiększa ich predyspozycje do roli kandydatów na sensory molekularne. Zaobserwowano także, że pochodna terfenylu oznaczona numerem 8 (pochodna cyjanowa) jest najmniej wrażliwa na zmiany zachodzące w otoczeniu.



Rysunek 9. Wykres stosunku intensywności fluorescencji przy zastosowaniu odpowiednich pochodnych terfenylu do roli sond molekularnych. Oznaczenia zgodne z Rysunkiem 1.

Badania spektroskopowe i strukturalne pochodnych terfenylu do roli fluorescencyjnych sensorów molekularnych

Celem niniejszych badań było przetestowanie pochodnych terfenylu do roli sensorów molekularnych używanych w technice FPT. Otrzymano dziesięć potencjalnych, fluorescencyjnych sensorów molekularnych, których struktura została potwierdzona widmami ^1H NMR i ^{13}C NMR. Podczas badania kinetyki reakcji polimeryzacji obserwujemy wzrost intensywności pasm fluorescencyjnych, co wskazuje na pomyślny przebieg procesu polimeryzacji. Nie jest to niestety wystarczający argument, aby określić otrzymane związki jako dobre sensory molekularne. Technika FPT wymaga, aby widma otrzymane przed polimeryzacją oraz po niej charakteryzowały się przesunięciem maksimum. Tylko wtedy wyznaczany stosunek intensywności pozwala na otrzymanie oczekiwanego profilu kinetycznego. Początkowe badania wskazywały, że związki te mogą nadawać się do monitorowania procesu fotopolimeryzacji, jednak kolejne testy nie potwierdziły postawionej na wstępie tezy.

Składam serdeczne podziękowania dr Mariuszowi Galek, dr hab. Ewie Witek oraz prof. dr hab. Piotrowi Kuśtrowskiemu zarówno za cenne uwagi dotyczące pracy, jak i poświęcony czas.

Dr Mariuszowi Galek dziękuję również za udostępnienie laboratorium oraz odczynników, a także wsparcie merytoryczne podczas prowadzonych badań.

**ZNACZENIE PROONKOGENNE FOSFATAZ TYROZYNOWYCH
SHP2 ORAZ PTP1B W ROZWOJU RAKA PIERSI**

**ROLE OF TYROSINE PHOSPHATASES
SHP2 AND PTP1B IN DEVELOPMENT OF BREAST CANCER**

**Tomasz Kostrzewa¹, Alicja Kuban-Jankowska², Anna Kostrzewa-Itrych,
Marcin Kawczyński, Zbigniew Maćkiewicz¹, Michał Woźniak²**

¹Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii, Katedra Biotechnologii Molekularnej,
Pracownia Chemii Makromolekuł Biologicznych
ul. Wita Stwosza 63, 80-307 Gdańsk

²Gdański Uniwersytet Medyczny, Katedra i Zakład Chemii Medycznej,
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk
kostrzewa_tomek@wp.pl

Streszczenie

Fosforylacja białek odgrywa kluczową rolę w procesach komórkowych, w tym w różnicowaniu, proliferacji, wzroście komórek oraz apoptozie. Podczas mitozy komórka ulega gwałtownym zmianom struktury komórkowej i organizacji. W jej wyniku następuje równomierne rozdzielenie cytoplazmy i organelli, prowadząc do równomiernego segregowania genomu i wytworzenia dwóch żywotnych komórek. Dynamiczna i odwracalna fosforylacja białek jest ważnym mechanizmem regulacyjnym, w której pośredniczą kinazy białkowe i fosfatazy. Nieprawidłowości podczas podziału komórkowego mogą prowadzić do namnażania się komórek o nieprawidłowej liczbie chromosomów. Jest to cecha charakterystyczna procesu nowotworowego, a także źródło wielu wad wrodzonych. Fosfataza tyrozynowa (PTP, ang. *protein tyrosine phosphatase*) to białko odpowiedzialne za złożone reakcje enzymatyczne. Odpowiada za defosforylację białek zawierających reszty tyrozynowe. Zaburzenia w jej działaniu mogą prowadzić do rozwoju procesów chorobowych, obejmujących promowanie onkogenezy, zmian rozwojowych oraz powikłań autoimmunologicznych i metabolicznych.

Abstract

Protein phosphorylation plays a significant role in cellular processes including differentiation, proliferation, cell growth and apoptosis. In the process of mitosis, the cell undergoes rapid changes in cell structure and its organization. As a result, a uniform distribution of cytoplasm and organelles takes place leading to an even segregation of the genome and a production of two viable cells. Protein kinases and phosphatases facilitate in dynamic and reversible protein phosphorylation which constitutes an important regulatory mechanism. Errors which occur during cell division can lead to proliferation of chromosomally abnormal cells which is a characteristic of cancer as well as the source of many congenital abnormalities. Tyrosine phosphatase is a protein responsible for complex enzymatic reactions necessary in dephosphorylation of proteins with tyrosine residues content. Its uncontrolled action can lead to medical conditions related with carcinogenic effect and autoimmune and metabolic developmental disorders.

1. Wprowadzenie

Fosforylacja białek jest fundamentalnym mechanizmem w fizjologii eukariontów i ważną modyfikacją potranslacyjną, która reguluje transdukcję sygnału w komórkach. Ocenia się, że co najmniej jedna trzecia białek komórkowych zawiera kowalencyjnie związany fosforan.¹

W ludzkim genomie znajduje się około 500 kinaz białkowych, przy czym około 90 jest swoistych dla reszt tyrozyny. Wszystkie kinazy białkowe, z rzadkimi wyjątkami, mają wspólną strukturę 3D, obejmującą strukturę β -kartki przy N-końcu białka, wiążącym ATP (adenozyno-5'-trifosforan) i część α -helikalną. Fosfatazy białkowe działają przeciwnie do białkowych kinaz, ponieważ odłączają reszty fosforanowe (defosforylują) od reszt aminokwasowych innych białek enzymatycznych i w ten sposób regulują ich działanie. Fosfatazy różnią się strukturalnie, mają różne miejsca aktywne, a także odmienne mechanizmy hydrolizy wiązania fosfomonoestrowego.²

Fosfatazy białkowe można podzielić na dwie główne grupy: fosfatazy fosfoserynowe oraz fosfatazy tyrozynowe.

2. Fosfatazy fosfoserynowe (PSPs, ang. *phosphoserine phosphatases*)

Fosfatazy fosfoserynowe (PSPs, ang. *phosphoserine phosphatases*) obejmują trzy główne rodziny: fosfatazy fosfoproteinowe (PPPs, ang. *phosphoprotein phosphatases*), fosfatazy białkowe metalo-zależne (PPM) i fosfatazy oparte na asparaginianach.³

Reprezentatywnymi członkami rodziny PPPs są białkowe fosfatazy PP1, PP2A, PP2B (powszechnie znana jako kalcyneuryna), PP4, PP5, PP6 i PP7.⁴

Białkowa fosfataza PP1 jest główną fosfatazą serynowo/treoninową obecną we wszystkich komórkach eukariotycznych. Bierze udział w procesie podziału komórkowego, apoptozie, syntezie białek, metabolizmie, reorganizacji cytoszkieletu i regulacji receptorów i kanałów membranowych. Regulacja funkcji komórkowych odbywa się poprzez interakcję podjednostki katalitycznej (PP1c) z ponad pięćdziesięcioma różnymi podjednostkami regulacyjnymi.⁵ Podjednostka katalityczna fosfatazy PP1 jest wysoce zachowana wśród wszystkich eukariotów, o podobieństwie sekwencji białka wynoszącym w przybliżeniu 70%.⁶

Fosfataza PP2A odgrywa ważną rolę w rozwoju, proliferacji, śmierci komórkowej i kontroli cyklu komórkowego.⁷ Odgrywa również zasadniczą rolę w utrzymaniu homeostazy sygnalizacyjnej w komórkach poprzez defosforylację różnych białek sygnałowych.⁸ Jest również prawdopodobnie ważnym supresorem nowotworowym,⁹ natomiast jej deregulacja może wpływać na aktywność wielu kinaz białkowych Ser/Thr związanych z chorobą Alzheimera.¹⁰

Kalcyneuryna (znana również jako białkowa fosfataza 2B lub PP2B) odgrywa ważną rolę w licznych procesach biologicznych zależnych od wapnia, w tym rozwoju

¹ P. Blume-Jensen, T. Hunter, *Nature*, 2001, 411, 355–365.

² D.L. Brautigan, *FEBS Journal*, 2013, 280, 324–325.

³ Y. Shi, *Cell*, 2009, 139, 468–484.

⁴ P.T.W. Cohen, *Cell*, 1997, 22, 245–251.

⁵ P.T.W. Cohen, *Journal of Cell Science*, 2002, 115, 241–256.

⁶ H. Ceulemans, M. Bollen, *Physiological Reviews*, 2004, 84, 1–39.

⁷ V. Janssens, J. Goris, *Biochemical Journal*, 2001, 353, 417–439.

⁸ K. Amanpreet, J. Westermarck, *Biochemical Society Transactions*, 2016, 44, 1683–1693.

⁹ M. Mumby, *Cell*, 2007, 130, 21–24.

¹⁰ J.M. Sontag, E. Sontag, *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2014, 7, 1–10.

neuroleptycznym i pamięci, odpowiedzi immunologicznej, przerostu mięśnia sercowego, transdukcji sygnału międzykomórkowego i rozwoju mięśni.¹¹

Fosfataza białkowa PP4 uczestniczy w progresji cyklu komórkowego i regulowaniu dojrzewania centrosomu. Ekspresja genów kodujących PP4 jest podwyższona w tkankach nowotworowych o różnym pochodzeniu, a jej nadekspresja w raku trzustki ma znaczenie prognostyczne.¹² W ostatnich badaniach wykazano również, że fosfataza PP4 hamuje wytwarzanie interferonu typu I w komórkach makrofagowych indukowanych przez wirusa Sendai (SeV, ang. *Sendai virus*) oraz wirusach pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (VSV, ang. *vesicular stomatitis virus*).¹³

Fosfataza białkowa PP5 ma plejotropowe znaczenie w sygnalizacji komórkowej, w tym naprawie uszkodzeń DNA, proliferacji komórek raka sutka oraz cyklu dobowym. Jej ekspresję obserwuje się również w kaskadach sygnalizacyjnych wywoływanych stresem, które regulują wzrost komórek i apoptozę. PP5 aktywuje receptor glikokortykosteroidowy i estrogenu w odpowiedzi na rozwijający się nowotwór. Inhibicja nadekspresji fosfatazy PP5 w nowotworze wątrobowo-komórkowym (HCC, ang. *hepatocellular carcinoma*) wydaje się być obiecującym celem terapeutycznym.¹⁴ Zahamowanie PP5 u chorych na astmę przywraca natomiast zdolność do hamowania produkcji chemokin CCL5 i CCL11 indukowanych przez czynnik martwicy nowotworu (TNF- α , ang. *tumor necrosis factor*). Proponowanym wytłumaczeniem wydaje się być fakt, iż komórki płuc astmatyków mają mniejszą wrażliwość na kortykosteroidy, co częściowo spowodowane może być zaburzeniami fosforylacji receptorów glikokortykosteroidowych wywołanych zwiększoną ekspresją PP5.¹⁵

3. Fosfatazy tyrozynowe (PTPs, ang. *protein tyrosine phosphatases*)

Białkowe fosfatazy tyrozynowe (PTPs, ang. *protein tyrosine phosphatases*) stanowią dużą rodzinę enzymów, które usuwają grupy fosforanowe (defosforylują) z reszt tyrozynowych białek. Funkcjonują w sposób skoordynowany z kinazami tyrozynowymi, kontrolując szlaki sygnałowe leżące u podstaw szerokiego spektrum procesów fizjologicznych komórek eukariotycznych, m.in. proliferacji, różnicowaniu oraz migracji¹. Fosforylacja reszt tyrozyny białek jest bardzo rzadka i wynosi ok. 0,01-0,1% ogółu fosfoprotein, jednakże odgrywa kluczową rolę w wielu procesach charakterystycznych dla organizmów wielokomórkowych.¹⁶

Aktualne badania wykazują związek PTPs z występowaniem licznych chorób nowotworowych, neurodegeneracyjnych, sercowo-naczyniowych, alergicznych, metabolicznych, infekcyjnych oraz immunologicznych. Fosforylacja tyrozynowa jest

¹¹ F. Rusnak, P. Mertz, *Physiological Reviews*, 2000, 80, 1483-1521.

¹² R. Essner, KW. Gong, D. Kaufman, H. Chen, C. Ginther, J. Dering, E. von Euw, B. Chmielowski, R. Finn, D. Slamon, *Cancer Research*, 2015, 75.

¹³ X. Liu, Z. Zhan, *Elsevier*, 2014, 70, 55.

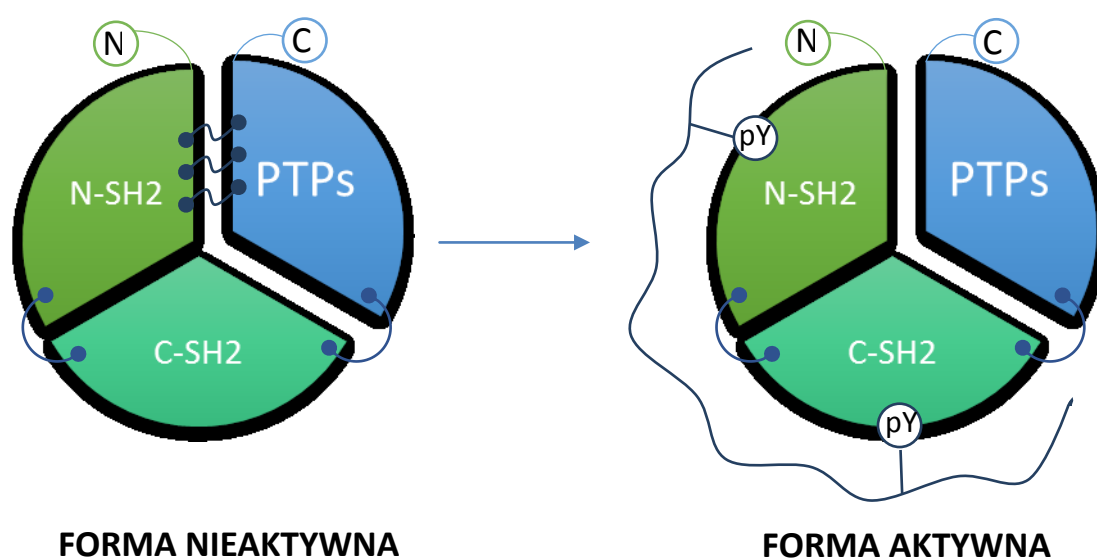
¹⁴ J. Oberoia, DM. Dunnb, MR. Woodfordb, L. Mariottia, J. Schulmanb, D. Bourbouliab, M. Mollapourb, CK. Vaughana, *PNAS*, 2016, 113, 9009-9014.

¹⁵ L. Chachi, M. Abbasian, A. Gavrilu, O. Tliba, C. Brightling, Y. Amrani, *European Respiratory Journal*, 2015, 46.

¹⁶ C. Tsoukas, *Springer Science & Business Media*, 2007, 53-55.

odwracalną modyfikacją potranslacyjną, która jest katalizowana przez tyrozynowe kinazy białkowe (PTKs, ang. *protein tyrosine kinases*).¹⁷

Na podstawie sekwencji aminokwasowych domen katalitycznych fosfatyz tyrozynowych, można je podzielić na cztery rodziny. Największą rodzinę PTPs stanowi I klasa. Rodzina ta zawiera 38 dobrze znanych "klasycznych" PTPs (związanych z tyrozyną) oraz 61 fosfatyz o podwójnej swoistości (specyficznych względem tyrozyny i seryny/treoniny lub tyrozyny i treoniny). Do II klasy zalicza się fosfatyz o małej masie cząsteczkowej zawierające reszty tyrozyny (LMWPTP), które są kodowane przez stosunkowo mały (18 kDa), pojedynczy gen. III klasa fosfatyz tyrozynowych obejmuje trzy fosfatyz tyrozynowo/treoninowe, wchodzące w proces cyklu komórkowego. Klasa IV zawiera cztery fosfatyz tyrozynowe i serynowo/tyrozynowe, których w odróżnieniu od pozostałych resztą katalityczną nie jest cysteina zaś resztą kwasu asparaginowego.¹⁸



Rys. 1. Fosfataza tyrozynowa SHP2 jest regulowana za pomocą mechanizmu „self-locking”. W przypadku braku białek zawierających reszty tyrozynowe (pY), SHP2 istnieje w zamkniętej konformacji z domeną N-SH2 blokującą miejsce katalityczne. Po związaniu odpowiednich białek, SHP2 jest otwierane tak, że substraty mogą wiązać się z miejscem aktywnym (na podstawie¹⁹).

W oparciu o lokalizację, PTPs klasyfikowane są jako transbłonowe (receptorowe), występujące w błonie komórkowej, oraz wewnątrzkomórkowe (cytozolowe), które zlokalizowane są w cytozolu, błonie śluzowej i retikulum endoplazmatycznym.²⁰

Cytozolowa fosfataza SHP-2 jest obecna w wielu tkankach i komórkach, uczestniczy w szlakach sygnalizacyjnych różnych czynników wzrostu – PDGF (płytkopochodny czynnik wzrostu, ang. *platelet-derived growth factor*), EGF

¹⁷ N. Aceto, M. Bentires-Alj, *Oncotarget*, 2012, 3, 514-515.

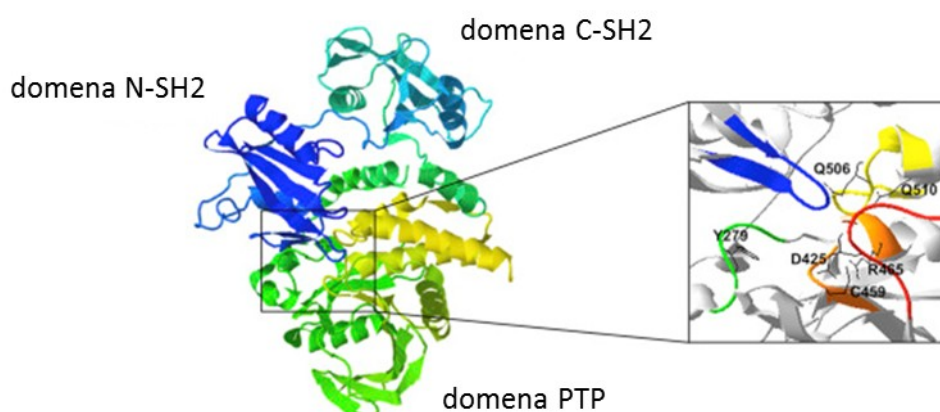
¹⁸ A. Kuban-Jankowska, M. Górka, N. Knap, F. Cappello, M. Woźniak, *Frontiers in Bioscience*, 2015, 20, 377-388.

¹⁹ JR Chan, GS Feng, *Blood*, 2007, 109, 862-867.

²⁰ JN Andersen, OH Mortensen, GH Peters, PG Drake, LF Iversen, OH Olsen, PG Jansen, HS Andersen, NK Tonks, NP. Moller, *Mol Cell Biol*, 2001, 21, 7117-7136.

(naskórkowy czynnik wzrostu, ang. *epidermal growth factor*) i IGF-1 (insulinopodobny czynnik wzrostu 1, somatomedyna C, ang. *insulin-like growth factor 1, somatomedin C*), cytokin – interleukiny 3 (IL-3), GM-CSF (czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów, ang. *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*), insuliny i interferonu.²¹ Ostatnie badania wykazały, że odgrywa ważną rolę w przekazywaniu sygnału z powierzchni komórki do jądra i jest ważnym wewnątrzkomórkowym regulatorem proliferacji i różnicowania komórek. Strukturalnie wykazuje podobieństwo do fosfataz swoistych dla komórek krwiotwórczych (SHP1). Zlokalizowana na domenie SH2, składa się z około 100 aminokwasów, które pośredniczą w wiązaniu SHP-2 z resztami ufosforylowanych tyrozyn.²²

Mechanizm działania fosfatazy SHP-2 pozostaje wciąż niewyjaśniony, jednakże uważa się, że poprzez defosforylację związanych z nią cząsteczek sygnalizacyjnych, zmniejsza ich lokalny przepływ sygnalizacji. Ostatecznym efektem działania fosfatazy SHP-2 jest zwiększenie transdukcji sygnału.²³ Badania *in vitro* wykazały, że SHP-2 odgrywa decydującą rolę w regulowaniu wielu aktywności komórkowych.²⁴



Rys. 2. Struktura fosfatazy SHP2 i jej domena katalityczna.²⁵

Nadekspresja fosfatazy SHP2 została udowodniona w przebiegu nowotworów hematologicznych, a zwłaszcza w młodzieńczej białaczce szpikowej oraz nowotworzeniu guza piersi.²⁶

Fosfataza tyrozynowa PTP1B składa się z domeny katalitycznej umiejscowionej przy domenie N-końcowej białka, dwóch motywów bogatych w prolinę i hydrofobowego regionu C-końcowego. W obrębie miejsca aktywnego znajduje się reszta cysteiny, która zaangażowana jest w defosforylację reszt tyrozyny z białek. Domena C-końcowa zakotwicza białko w powierzchni cytoplazmatycznej retikulum endoplazmatycznego. Wykrycie ekspresji PTP1B w guzach nowotworowych dostarczyło dowodów na rolę tej fosfatazy w patogenezie raka piersi.²⁴

²¹ GS Feng, CC Hui, T. Pawson, *Science*, 1993, 259, 1607–1611.

²² CA Koch, D Anderson, MF Moran, C Ellis, T Pawson, *Science*, 1991, 252, 668–674.

²³ BG Neel BG, NK Tonks, *Curr Opin Cell Biol*, 1997, 9, 193–204.

²⁴ Cheng Kui QU, *Cell Research*, 2000, 10, 279–288.

²⁵ M. Tajana, A. de Rocca Serraa, P. Valeta, T. Edouardc, A. Yarta, *European Journal of Medical Genetics*, 2015, 58, 509–525.

²⁶ G. Chan, D. Kalaitzidis, BG Neel, *Cancer Metastasis Rev.*, 2008, 27, 179–192.

4. Rak piersi

Rak piersi jest najczęściej występującym nowotworem złośliwym u kobiet w Polsce. Stanowi około 22% spośród wszystkich zachorowań na nowotwory. W roku 2010 zapadło na tę chorobę ok. 16 000 kobiet. W ciągu ostatnich trzech dekad liczba chorych wzrosła ponad 2-krotnie. Szacuje się, że rocznie rak piersi rozpoznawany jest u 1,5 miliona kobiet na całym świecie, a około 400 tysięcy umiera z tego powodu. Jest to najczęstszy nowotwór złośliwy wśród mieszkanek krajów wysoko cywilizowanych, takich jak USA, Kanada, Australia czy kraje Europy Zachodniej.²⁷

Etiologia większości przypadków raka piersi nie jest w pełni znana. Najważniejszymi czynnikami ryzyka zachorowania są: dojrzały wiek, późna menopauza, długotrwała hormonalna terapia zastępcza, ekspozycja na promieniowanie jonizujące oraz nosicielstwo mutacji niektórych genów (przede wszystkim BRCA1 i BRCA2). W większości przypadków zachorowań na raka piersi obserwuje się nosicielstwo mutacji lub polimorficznych alleli wielu różnych genów uczestniczących m.in. w kontroli metabolizmu hormonów steroidowych oraz egzo- i endogennych kancerogenów, procesach naprawy uszkodzonego DNA, regulacji cyklu proliferacyjnego komórek i procesu apoptozy, a także syntezy czynników wzrostowych lub ich receptorów.²⁸

W raku piersi wyróżnić możemy czynniki prognostyczne i predykcyjne. Czynniki prognostyczne pozwalają określić przebieg choroby niezależnie od zastosowanego leczenia. Do klasycznych czynników zaliczamy: wielkość guza, stan pachowych węzłów chłonnych, typ histologiczny guza, stopień złośliwości, obecność komórek nowotworowych w naczyniach limfatycznych i krwionośnych. Istotne znaczenie dla wyboru metody leczenia, jak również rokowania, mają czynniki predykcyjne, które wskazują na potencjalną odpowiedź na planowane leczenie. Najważniejszym czynnikiem predykcyjnym jest obecność w komórkach raka receptorów dla hormonów płciowych. U około 60% chorych stwierdza się zarówno receptory estrogenowe (ER) i progesteronowe (PgR) zaś u ok. 20% tylko jeden z tych receptorów. Brak receptora obserwuje się u pozostałych 20% chorych.²⁹ Chora bez ekspresji receptorów steroidowych są niepodatne na leczenie hormonalne. Ekspresja receptorów steroidowych wiąże się również z lepszym rokowaniem, ale i mniejszą wrażliwością na chemioterapię.

Aktualne leczenie nowotworu piersi obejmuje radioterapię, leczenie hormonalne, chemioterapię, podawanie przeciwciał monoklonalnych, zaś w ostateczności mastektomię.²⁸

5. Rola fosfataz SHP2 i PTP1B w raku piersi

Białkowe fosfatazy tyrozynowe (PTPs) to kluczowe enzymy komórkowe, które regulują wiele ścieżek sygnałowych poprzez szybką defosforylację fosforylowanych reszt tyrozynowych i są istotne dla regulacji zarówno sygnału metabolicznego, jak i onkogenego. Zaburzenie fosforylacji tyrozynowej może prowadzić do rozwoju nowotworu charakteryzującego się nieprawidłowym wzrostem i potencjałem

²⁷ J. Didkowska, U. Wojciechowska, *Zachorowania i zgony na nowotwory złośliwe w Polsce. Krajowy Rejestr Nowotworów, Centrum Onkologii - Instytut im. Marii Skłodowskiej - Curie*, Dostępne na stronie <http://onkologia.org.pl/k/epidemiologia/>, dostęp z dnia 06.06.2017.

²⁸ *Onkologia w praktyce klinicznej - zalecenia postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w nowotworach złośliwych: Rak piersi*, pod red. J. Jassem, 2007, 180-218.

²⁹ B. Karczmarek-Borowska, *Przegląd Medyczny Uniwersytetu Rzeszowskiego*, 2009, 4, 350-355.

przerzutowym.³⁰ Istnieją dowody, że niektóre PTPs mogą funkcjonować jako supresory procesu nowotworzenia, natomiast liczne fosfatazy tyrozynowe, regulujące aktywność czynników wzrostu (np. SHP2 kodowana przez gen PTPN11) mogą promować powstawanie nowotworu. Aktywacja mutacji SHP2 występuje w wielu typach nowotworów, w tym białaczkach, neuroblastomie, glejaku, raku jelita grubego, żołądka, piersi oraz w szpiczaku mnogim. Szczególnie istotne zaś w leczeniu raka piersi wydają się być fosfatazy SHP2 i PTP1B.^{19,31,32}

Kontrola aktywności fosfataz tyrozynowych w szczególności regulowana jest przez utlenianie reszty cysteiny, występującej w centrum katalitycznym w postaci anionu tiolanowego. Utrata aktywności katalitycznej enzymu warunkowana jest poprzez jej utlenienie. W zależności od stopnia utlenienia, katalityczna reszta cysteiny może przekształcić się w resztę kwasu sulfenowego (SOH), kwasu sulfinowego (SO₂H) lub sulfonowego (SO₃H).³³ Przypuszcza się, że odwracalne utlenienie katalitycznej cysteiny może być uniwersalnym mechanizmem regulacji aktywności białkowych fosfataz tyrozynowych. Udział białkowych fosfataz tyrozynowych w tworzeniu się nowotworów może być częściowo związany ze zwiększonym wytwarzaniem reaktywnych form tlenu (ROS) w komórkach rakowych, w porównaniu do normalnych komórek, co może prowadzić do zaburzonej regulacji PTP przez utlenienie.³⁴

Białkowa fosfataza tyrozynowa PTP1B odgrywa kluczową rolę w sygnalizacji metabolicznej i jest obiecującym celem terapeutycznym leku na cukrzycę typu 2 i otyłość. Zebrane dowody wskazują również, że PTP1B jest zaangażowana w rozwój raka, przy czym może wywierać działanie zarówno hamujące nowotwór, jak i promowanie rozrostu guza. Białkowa fosfataza tyrozynowa PTP1B defosforyluje kinazy tyrozynowe istotne w indukcji nowotworu piersi t.j. HER1/EGFR, Src, JAK i STAT. Fosfataza PTP1B jest nadeksprymowana w komórkach raka piersi i inicjuje powstawanie guza. Poziomy PTP1B różni się nie tylko w zależności od typu komórki, ale pewną rolę odgrywają również zmiany środowiskowe. Dowiedziono, iż w dietach o wysokiej zawartości fruktozy wzrasta wątrobowy poziom transkrypcji PTP1Bw przeciwieństwie zaś do głodówki, która powoduje efekt odwrotny.³⁵

Choć wczesne stadium raka piersi nie jest zagrożeniem dla życia, jego rozwój z przerzutami jest odpowiedzialny za większość zgonów spowodowanych nowotworami. Komórki nowotworowe migrują do innych odległych narządów, co prowadzi do wtórnego powstawania guzów, atakując naczynia krwionośne i limfatyczne. Chirurgiczne usunięcie nowotworu pierwotnego również może pozwolić na nawrót choroby w postaci przerzutów.³⁶ Z uwagi na fakt, iż to właśnie przerzuty są w głównej mierze odpowiedzialne za śmiertelność w następstwie rozwoju nowotworu piersi, ważne jest zrozumienie mechanizmów, które odpowiedzialne są za pojawienie się wtórnych ognisk nowotworowych. Wykazano, iż znaczna liczba cząsteczek,

³⁰ A. Östman, C. Hellberg, F.D. Böhmer, *Nature Rev*, 2006, 6, 307-320.

³¹ K.S. Grossmann, M. Rosário, C. Birchmeier, W. Birchmeier, *Adv. Cancer Res.*, 2010, 106, 53–89.

³² C. Peifen, G. Wenjie, Y. HuaQin, L. Qian, W. Weicheng, S. Yang, L. Xiaomin, G. Yanhong, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2014, 68, 285–290.

³³ J. den Hertog, A. Groen, T. van der Wijk, *Arch Biochem Bioph*, 2005, 434, 11-15.

³⁴ GY Liou, P. Storz, *Free Radic Res*, 2010, 44, 479-496.

³⁵ LE. Arias-Romero, S. Saha, O. Villamar-Cruz, Shu-Chin Yip, SP. Ethier, Zhong-Yin Zhang, J. Chernoff, *Cancer Res*, 2009, 69, 4582-4588.

³⁶ AZ Fernandis, A. Prasad, H. Band, R. Klosel, RK Ganju, *Oncogene*, 2004, 23, 157–167.

takich jak cytokiny, chemokiny i czynniki wzrostu odpowiedzialna jest za charakter przerzutowy komórek raka piersi.³⁷

Przerzuty komórek raka piersi są złożonym procesem, zaś chemotaksja i inwazja komórek nowotworowych mają kluczowe znaczenie dla ich rozwoju. Proces ten obejmuje także wydzielanie różnych enzymów hydrolitycznych, takich jak metaloproteazy. Prowadzą one do degradacji pobliskiej substancji międzykomórkowej i penetracji komórek przez membranę podstawową do krążenia krwi, a następnie rozprzestrzeniają się oraz ulegają adhezji do śródbłonna. Chociaż receptor chemokinowy CXCR4 i jego pokrewny ligand, CXCL12, okazały się odgrywać ważną rolę w przerzutach raka piersi, ich mechanizmy sygnalizacyjne w rozwoju komórek nowotworowych raka piersi nie zostały dotąd wyjaśnione. Poprzez zastosowanie różnych inhibitorów szlaku sygnałowego stwierdzono między innymi, że fosfataza SHP2 odgrywa ważną rolę w chemotaksji indukowanej przez CXCL12 i chemoinwazji komórek raka piersi.³⁴

Ostatnie badania wykazały ponadto, iż fosfataza SHP2 tworzy kompleks z receptorami estrogenu w pobliżu błony cytoplazmatycznej reagującej na stymulację estrogenów, a następnie transdukowany sygnał estrogenu przez wyzwalanie szlaków cytoplazmatycznych ERK (kinaza regulowana zewnątrzkomórkowo, ang. *extracellular signal-regulated kinase*) i AKT (serynowo-treoninowa kinaza białkowa, ang. *serine/threonine protein kinase*) indukuje proliferację komórek raka piersi. Dokładne mechanizmy przenoszenia białka receptora estrogenu do cytoplazmy i związek z SHP2 nie są jednakże znane.³⁸ Wnioskuje się natomiast, że SHP2 może być dotąd nieznanym kompleksem zewnątrzkomórkowym związanym z receptorem estrogenowym, który może wyzwać kaskady kinazy cytoplazmatycznych, aby pośredniczyć w genomowym lub niegenomowym działaniu estrogenu.³⁹

6. Podsumowanie

Ze względu na kluczowy udział białkowych fosfataz tyrozynowych w biologii nowotworów, mogą stanowić one obiecujące cele dla rozwoju nowych przeciwnowotworowych strategii diagnostycznych i terapeutycznych.⁴⁰ Ich powstanie może być możliwe w wyniku pogłębionego zrozumienia sieci sygnalizacyjnych wpływających na inicjację guza, progresję i przerzuty. Badania w zakresie fosfataz tyrozynowych, które dostarczą nowych informacji na temat kaskad sygnalizacyjnych wpływających na komórki inicjujące nowotwór oraz ich roli w patofizjologii, mogą zaowocować zaprojektowaniem nowego, bezpiecznego i skutecznego leczenia nowotworu piersi.

Praca powstała w ramach realizacji projektu Iuventus Plus Nr IP2015 038774 z MNiSW.

³⁷ A. Östman, C. Hellberg, F.D. Böhmer, *Nature Reviews Cancer*, 2006, 6, 307-320.

³⁸ PH Driggers, JH Segars, *Trends Endocrinol Metab*, 2002, 13, 422-427.

³⁹ J. Li, Y. Kang, L. Wei, W. Liu, Y. Tian, B. Chen, X. Lin, Y. Li, GS. Feng, Z. Lu, *PLOS ONE*, 2014, 9, 1-13.

⁴⁰ LM Scott, HR Lawrence, SM Sehti, NJ Lawrence, J. Wu, *Curr Pharm Des*, 2010, 16, 1843-1862.

CHROMATOGRAPHIC STUDY OF THE PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF [4-(4-TRANS-ETHYLCYCLOHEXANECARBONYL) OXYPHENYL] 4-(4-TRANS-PROPYLCYCLOHEXYL) BENZOATE

CHROMATOGRAFICZNE BADANIA FIZYKOCHEMICZNYCH WŁAŚCIWOŚCI 4-TRANSETYLOCYKLOHEKSYLO-4'-BENZESO-BENZENO-4,4'-N-PROPYLOCYKLOHEKSYLANU

Justyna Jonik¹, Henryk Grajek¹, Marcin Purchała¹, Tomasz Wawer¹

¹Wojskowa Akademia Techniczna im. Jarosława Dąbrowskiego,
Wydział Nowych Technologii i Chemii, Instytut Chemii,
ul. Kaliskiego 2, 01-476 Warszawa
justyna.jonik@wp.pl

Abstract

The inverse gas chromatography was employed for the physicochemical properties of [4-(4-trans-ethylcyclohexanecarbonyl)oxyphenyl]4-(4-trans-propylcyclohexyl)benzoate at the temperatures for solid and smectic B phase. The results of these tests were elution peaks that were subjected to the appropriate mathematical calculations. The retention times of the centre of gravity of the elution peaks were used for the estimation of the values of the specific retention volumes. The values of the thermodynamic functions, that is the molar enthalpy of adsorption and dissolution and the molar entropy of adsorption and dissolution were also estimated.

Streszczenie

W niniejszej pracy badano właściwości fizykochemiczne 4-transetylocykloheksylo-4'-benzeso-benzeno-4,4'-n-propylocykloheksylanu w temperaturach obejmujących ciało stałe i fazę smektyczną B. Wykorzystaną metodą pomiarową była inwersyjna chromatografia gazowa. Wynikiem przeprowadzonych badań były piki elucyjne, które poddano odpowiedniej obróbce matematycznej i otrzymano w ten sposób czasy retencji środka ciężkości piku elucyjnego, na podstawie których obliczono właściwe objętości retencji, a także podstawowe wielkości termodynamiczne, czyli molową różniczkową entalpię adsorpcji i rozpuszczania oraz molową różniczkową entropię adsorpcji i rozpuszczania.

1. Introduction

Liquid crystals are the intermediate state of matter between completely disordered liquids and spatially structured (three-dimensional) crystals. Thus they show the properties typical of liquids, such as flow ability, and the characteristics properties of crystals, such as ordering the particles in a certain direction in space or anisotropy of optical, electrical and magnetic properties.^{1,2}

Liquid crystal materials were novelty chemical compounds when they were first discovered in about 1888 by H. Reinitzer. He was an Austrian botanist.³ Reinitzer found the compound cholesteryl benzoate changed phases on heating. At room temperature the benzoate is a white crystalline solid. On heating to 145 °C the crystal structure collapses to form a turbid liquid (liquid crystal). On further heating the turbid structure collapses at 179 °C to a liquid. On cooling the process reverses itself.⁴

Presently liquid crystals can be divided into two categories, thermotropic and lyotropic, according to the principal means of destroying the order in the parent solid state.⁴

When the destruction of the molecules ordering is due to melting, we are talking about thermotropic liquid crystals. They occur as a result of the phase transition at the melting point (as determined by the melting point), moving from the solid phase to the liquid crystal phase. Further heating to the so-called clarification temperature causes the transition from liquid crystal to isotropic liquid state. The temperature is the thermodynamic parameter of the process. On the other hand, lyotropic liquid crystals are compounds formed by the dissolution of mesogens in a suitable solvent (i.e., polar or nonpolar), and their properties depend on temperature and concentration.^{5,6} An example of a liquid crystal of this type is the micelle. Assuming that the solvent is water, actually a polar substance, The arrangement of the micelle particles will be as follows: blue, i.e., 'polar heads' will look for the polar environment, because they have the same character – they will settle outside the micelle. Whereas, yellow and non-polar 'tails' will hide in its centre.⁷

The liquid crystalline phase occurs in compounds with an appropriate molecular structure, more often having the shape of an elongated rod or shape of the disk, depending on the order of the liquid crystals molecules, which can be divided into three groups: smectic, nematic and cholesteric.⁷

Smectics are a group of liquid crystals with the highest degree of order. They are characterized by layered as well as parallel arrangement of molecules. It makes liquid crystals of this type have a rigid structure and high viscosity. Nematics have a structure resembling an image of threads. There is no other order except for the

¹ D. Andrienko, *Introduction to liquid crystals*; Bad Marienberg, 2006, 2.

² W. Witko, *Ciekłe kryształy – wczoraj, dziś i jutro*; 2002, 2.

³ T.Y. Puttewar, A.A. Shinde, R.Y. Patil, *ARPB*, 2014, 4, 571-575.

⁴ G.H. Brown, *Journal of Chemical Education*, 1983, 60, 900-905.

⁵ N. Osiecka, *Wybrane zasady Schiffa – badanie struktury i dynamiki*; IFJ im. H. Niewodniczyńskiego PAN, Kraków, 2004, 7.

⁶ W. Otowski, G. Pabian, *Czasopismo Techniczne, seria Nauki Podstawowe*, 2009, 1, 96.

⁷ K. Dobrosz-Teperek, B. Dasiewicz, *Nauka i Technika*, 2006, 5, 6-7.

Chromatographic study of the physicochemical and the separation properties of [4-(4-trans-ethylcyclohexanecarbonyl)oxyphenyl]4-(4-trans-propylcyclohexyl)benzoate

parallelism of particles. Molecules can move in all three directions and freely rotate along their long axes. Cholesteric liquid crystals are distinguished by the fact that the molecules lie in layers arranged parallel to each other, twisted with respect to each other by a slight angle. Such arrangement makes them willingly used as stationary phases. The first liquid crystals belonging to this group were the cholesterol derivatives from which their name originates.^{7,8}

In gas chromatography, thermotropic liquid crystals with a rod-like particle size are mainly used as stationary phases. They are characterized by an average polarity, which is advantageous because they can separate both polar and nonpolar analytes. The interaction of liquid crystals with different analytes depends, however, more on the shape of the molecules of the chromatographed substances interacting with the ordered liquid crystal structure. Therefore, when chromatographing analytes with less-elongated molecular structure on rod-like liquid crystals, they are shortly retained in the column than those having more elongated molecules. An example of this phenomenon can be observed when orto- and para- xylene pair is separated from meta xylene. At regular stationary phases, the order of elution of these isomers follows the increasing boiling point, i.e., the para-xylene is eluted as the first. On the other hand, on the liquid-crystalline phases para-xylene is retained longer. A similar effect is obtained by separating bromo or chloro isomers of phenol, whereas – para isomers give longer retention times compared with the other two.^{3,9}

Liquid-crystalline stationary phases are very useful for separating isomers of similar boiling points. Some of them can be used in a wide range of column temperatures, what is difficult to accomplish on traditional stationary phases. The liquid crystals with a melting point of up to 100 °C and a clarification temperature of up to 200 °C are employed throughout the mesophase range and sometimes in the isotropic liquid range. By contrast, the use of liquid crystals with a clarification temperature above 200 °C is limited to the mesophase range only. However, the liquid-crystalline stationary phases can be used above this temperature only thorough drying and deoxidation of the carrier gas.^{3,9}

Of course, liquid-crystalline stationary phases having a much broader range of liquid-crystalline structure are known and they can be employed at column temperatures above 300 °C for chromatographic analysis with programmable column temperature. Some liquid crystal structures are found in the temperature range of over 200 °C (from the melting point to the clarification temperature). It is the most advantageous to employ liquid crystals having the same structure throughout the mesophase range – such a requirement best meets the nematic. The liquid crystals have wide temperature ranges for the existence of liquid-crystalline structure and good resolution properties. The other property is also fulfilled by smectics with a relatively low degree of order. The extent of the liquid phase crystalline state can be broadened by preparing two- or three-component mixtures, that exhibit better

⁸ ChH. Lin, *Advances in Materials Science and Engineering*, 2012, 2-6.

⁹ Z. Witkiewicz, J. Kałużna-Czaplińska, *Podstawy chromatografii i technik elektromigracyjnych*; WNT, Warszawa, 2011, 14-156.

distribution properties than their constituents. A similar effect will be attained by using a mixture of a liquid crystal and an ordinary stationary phase.⁹

The existence of the temperature range of liquid-crystalline state can be widened by supercooling the liquid-crystalline phase below the melting point. Both single and mixed liquid-crystalline phases can be subjected to this temperature treatment. Cooling the liquid-crystalline phase can be up even to several dozens below melting point and it can last for many hours. Despite the retention times of the chromatographed substances employing supercooled stationary phases are longer, the separation is usually better than above the melting point.⁹

The liquid-crystalline stationary phases have been successfully employed in the separation of aromatic hydrocarbons and their derivatives, polar compounds containing oxygen in the molecule (viz., alcohols, acids), cis and trans isomers and many others substances.^{9,10}

2. Materials and methods

We tested a thermotropic liquid crystal, whose structural pattern and phase transition diagram is shown in Figure 1.

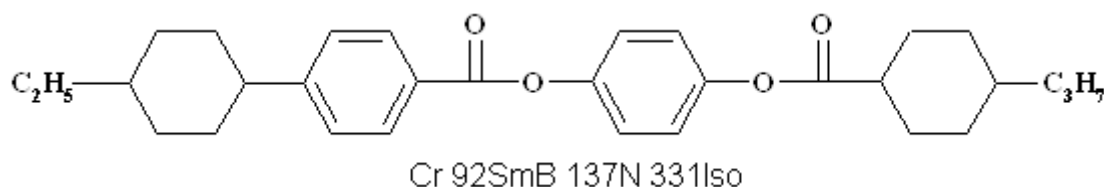


Figure 1. The structural pattern and the phase diagram of the liquid crystal tested.

Generally the thermal stability of liquid stationary phases is limited – after exceeding a certain maximum temperature, there is a risk of the so called bleeding the stationary phase. To avoid this phenomenon, prior to the commencement of proper chromatographic measurements a thermogravimetric study was performed (TG) – that's why, the sublimation temperature of the liquid crystal was estimated. The resulting thermogram is depicted In Figure 2.

¹⁰ D. Bélaïdi, S. Sebih, M.H. Guermouche, J.P. Bayle, S. Boudah, *Chromatographia*, 2003, 57, 207.

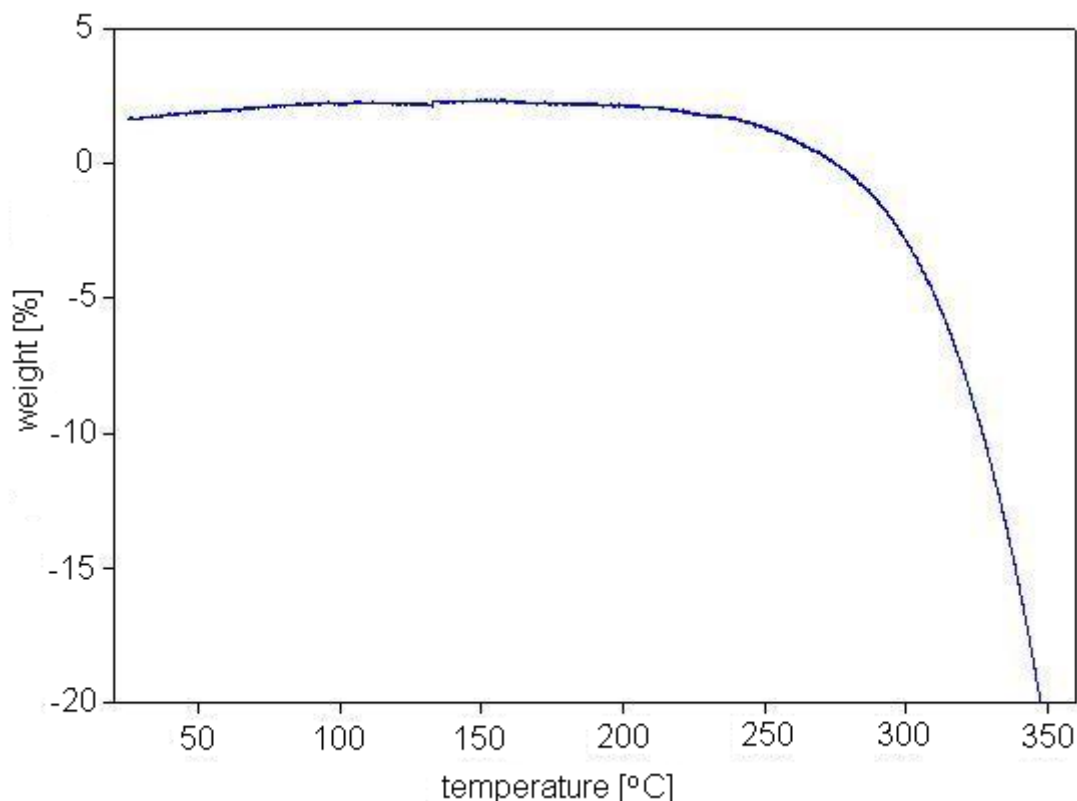


Figure 2. The thermogram of the tested liquid crystal.

The TG tests were performed in argon (5.0 purity, at 50 cc/min) at a heating rate of 1 K/min in the range of 25-350 °C. The sublimation temperature was detected at 302 °C, but the process already started at 215 °C.

The inverse gas chromatography tests at infinite dilution (IGC-ID) were performed by means of the Unicam type 610 apparatus with a high sensitivity of flame ionization detector with the AC-DC converter. In order to accomplish the infinite dilution conditions, vapours of the testing substances were injected into column by means of the Hamilton type 7000.5KH syringe. The chromatographic peaks were acquired at the sampling rate equal to 25 Hz. The following software have been employed for all calculations: chromatograph's software Unicam 4880, Microsoft Office Excel 2010, Syntat Software TableCurve 2D v5.01 and Daniel G. Hyams CurveExpert Professional 2.0. The chromatographic conditions are collated in Table 1.

Chromatographic study of the physicochemical and the separation properties of [4-(4-trans-ethylcyclohexanecarbonyl)oxyphenyl]4-(4-trans-propylcyclohexyl)benzoate

Table 1. Chromatographic conditions.

Temperature of injector	160 °C
Temperatures of column	80, 83, 86, 88, 90, 92, 94, 100, 105, 111 °C
Temperature of detector	160 °C
Carrier gas used	helium N5.2, pure for analysis
Carrier gas flow-rate	20±0.5 cm ³ /min
Mass of column filling (LC)	1.10774 g
Detector's sensitivity	10 mV
Specific surface area S_{BET}	1 m ² /g ¹¹
Testing substances	n-heptane, n-octane, n-nonane, n-decane, n-undecane, ethyl acetate, n-propyl acetate, n-butyl acetate, xylene's isomers

The first step for the preparation of the acquired data for the relevant calculations was to convert them to the ACSII code. The resulting file contained all flow disturbance caused by the sample being injected into the carrier gas stream. The data thus obtained were loaded into software the TableCurve 2D v5.01 that enables the description of the data set by a suitable mathematical function to obtain the highest value of the nonlinear correlation coefficient. The following mathematical functions were employed for the description of the primary elution data (Eq. 1 – the P4 function and Eq. 2 – the EMG function).¹²

$$c(t) = h_{max} \frac{\left[1 + \frac{\left(t - \frac{ws_2}{2s_1} - t_R^{cg} \right)^2}{w^2} \right]^{-s_1} \exp \left[-s_2 \left(\tan^{-1} \left(\frac{t - \frac{ws_2}{2s_1} - t_R^{cg}}{w} \right) + \tan^{-1} \left(\frac{s_2}{2s_1} \right) \right) \right]}{\left(1 + \frac{s^2}{4s_1^2} \right)^{-s_1}} \quad (1)$$

$$c(t) = \frac{h_{max} * w * \sqrt{2\pi}}{2s} \exp \left(\frac{t_R^{cg} - t}{s} + \frac{w^2}{2s^2} \right) \left[\frac{s}{|s|} - \operatorname{erf} \left(\frac{t_R^{cg} - t}{\sqrt{2}w} + \frac{w}{\sqrt{2}s} \right) \right] \quad (2)$$

where:

c(t) – the time dependent concentration of the testing substance,

h_{max} – the height of the elution peak,

t – the elution time of the testing substance,

w – the width of the elution peak,

s – the parameter related to the symmetry of the elution peak,

t_R^{cg} – the retention time of the centre of gravity of the elution peak.

Based on the retention times of the centres of gravity of the elution peaks for the testing substances the values of the specific retention volumes referred to 1 gram of the column filling and its specific surface area were calculated. The values of the

¹¹ Dostępne na stronie: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c6514?lang=pl®ion=PL>; dostęp z dnia 09.06.2017.

¹² TableCurve 2D: Automated curve fitting and equation discovery: version 5.01 for windows; user's manual. Richmond, CA: SYSTAT, 2002.

Chromatographic study of the physicochemical and the separation properties of [4-(4-trans-ethylcyclohexanecarbonyl)oxyphenyl]4-(4-trans-propylcyclohexyl)benzoate

specific retention volumes calculated in this way are the physicochemical constants (Eqs 3, 4 and 5).^{13, 14}

$$V_g = \frac{V_N}{m} * \frac{T_C}{273.15} \quad (3)$$

$$V_N = j_3^2 \left(\frac{p_0 - p_{H_2O}}{p_0} \right) F_C (t_R^{cg} - t_M) \frac{T_C}{T_0} \quad (4)$$

$$j = \frac{3 \left[\left(\frac{p_i}{p_0} \right)^2 - 1 \right]}{2 \left[\left(\frac{p_i}{p_0} \right)^3 - 1 \right]} \quad (5)$$

where:

V_g – the specific retention volume,

V_N – the net retention volume,

m – the mass of column filling,

T_C – the column temperature,

j – James-Martin compressibility factor,

p_0 and T_0 – atmospheric pressure and temperature,

p_{H_2O} – the pressure of water vapour at environment temperature,

F_C – the volumetric flow rate of the carrier gas through the column, measured by soap flow-meter at the constant column temperature,

t_R^{cg} and t_M – the retention time of the centre of gravity of the probe and the hold-up time,

p_i – the inlet pressure at the column.

The molar differential enthalpy and entropy of adsorption and dissolution can be estimated on the basis of the temperature dependencies of the specific retention volumes referred to 1 gram of the column filling and its specific surface area or the adsorption and dissolution virial coefficients. The following equation can be employed for the aforementioned calculations¹³:

$$\ln \frac{V_g^{1g}(T_C)}{T_C} = \frac{-\Delta H_{A/D}}{R} \frac{1}{T_C} + \frac{\Delta S_{A/D}}{R} + \ln(R * S_{BET} * m) \quad (6)$$

where:

$V_g^{1g}(T_C)$ – the specific retention volume referred to the centre of gravity of the elution peak and to 1g of stationary phase,

$\Delta H_{A/D}$ – the molar differential enthalpy of adsorption/dissolution,

R – gas constant (8.314 J/mol*K),

$\Delta S_{A/D}$ – the molar differential entropy of adsorption/dissolution,

S_{BET} – the specific surface area of LCSP.

¹³ J. Paciura-Zadrożna, *Chromatograficzne badania właściwości powierzchniowych uporządkowanych mezoporowatych adsorbentów krzemionkowych*; WAT, Warszawa, 2011.

¹⁴ Ł. Farczak, *Chromatograficzne badania zredukowanego i utlenionego grafenu*; WAT, Warszawa, 2015, 51.

Chromatographic study of the physicochemical and the separation properties of [4-(4-trans-ethylcyclohexanecarbonyl)oxyphenyl]4-(4-trans-propylcyclohexyl)benzoate

3. Results and discussion

Examples of the values of the coefficients of nonlinear correlation are collated in Table 2 and compared between P4 and EMG functions. Those of them with higher values were underlined. In the majority of cases, the r^2 values for the P4 function are higher – this means that the function more accurately describes the data introduced. There have been cases where the value of this coefficient is higher for the EMG function, however no relationship was found between the column temperature or the testing substance employed and the value of r^2 .

Table 2. Examples of the values of the coefficients of nonlinear correlation compared between P4 and EMG functions.

90 °C						
testing substance	P4			EMG		
	t_R [min]	σ [%]	r^2	t_R [min]	σ [%]	r^2
n-heptane	1.5525	0.0707	<u>0.9971</u>	1.5526	0.0705	0.9970
n-octane	1.6021	0.0500	<u>0.9979</u>	1.6020	0.0548	0.9978
n-nonane	1.7100	0.0924	<u>0.9897</u>	1.7096	0.0886	0.9893
n-decane	1.9188	0.0580	<u>0.9920</u>	1.9188	0.0580	0.9912
n-undecane	2.3392	0.3304	<u>0.8199</u>	2.3417	0.2533	0.7986
ethyl acetate	1.8558	0.2920	<u>0.9919</u>	1.8548	0.2499	0.9898
n-propyl acetate	2.0175	0.0411	<u>0.9594</u>	2.0177	0.0460	0.9534
n-butyl acetate	2.3400	0.1156	<u>0.9246</u>	2.3412	0.1132	0.9217
p-xylene	1.7013	0.8439	<u>0.9620</u>	1.7017	0.8277	0.9597
m-xylene	1.6993	0.6161	<u>0.9720</u>	1.6992	0.6250	0.9717
o-xylene	1.7493	1.3569	<u>0.9901</u>	1.7491	1.3458	0.9896
92 °C						
n-heptane	1.5262	0.1346	0.9964	1.5263	0.1361	<u>0.9965</u>
n-octane	1.5752	0.0411	<u>0.9948</u>	1.5752	0.0411	0.9947
n-nonane	1.6755	0.0920	<u>0.9949</u>	1.6747	0.0886	0.9947
n-decane	1.8622	0.0619	<u>0.9967</u>	1.8622	0.0619	0.9961
n-undecane	2.2392	0.1790	<u>0.9414</u>	2.2382	0.1924	0.9405
ethyl acetate	1.8542	0.1451	<u>0.9679</u>	1.8540	0.1532	0.9655
n-propyl acetate	1.8911	0.0497	<u>0.9920</u>	1.8921	0.0526	0.9896
n-butyl acetate	2.1492	0.1603	<u>0.9674</u>	2.1512	0.1666	0.9654
p-xylene	1.7102	0.4923	0.9958	1.7100	0.4836	<u>0.9959</u>
m-xylene	1.7267	0.3403	0.9916	1.7266	0.3577	<u>0.9917</u>
o-xylene	1.7617	0.2418	<u>0.9837</u>	1.7615	0.2616	0.9836

The variation of retention time with temperature for each testing substance are shown in Figure 3 (P4 function). The elution order of n-heptane, n-octane and n-nonane at all the column temperatures employed was the same for the three substances. Up to 90 °C, the n-decane left the column earlier than ethyl acetate, then the order changed. N-propyl acetate was eluted after them. Up to the phase transition temperature n-undecane had a shorter retention time than n-butyl acetate. The elution order has changed over the transition temperature. Analyzing the suitable plots one can state that for the most testing substances the values of retention times do not differ significantly. We can observe some exceptions for n-decane, ethyl acetate and n-propyl acetate, and n-undecane and n-butyl acetate, for which it can be observed. It can be caused to the fact that these substances eluted from the column for a long time (peak tailing occurred). It is worth noting that as the temperature rises, the scattering of the measuring points decreases – with the increase of the column temperature the retention time decreased.

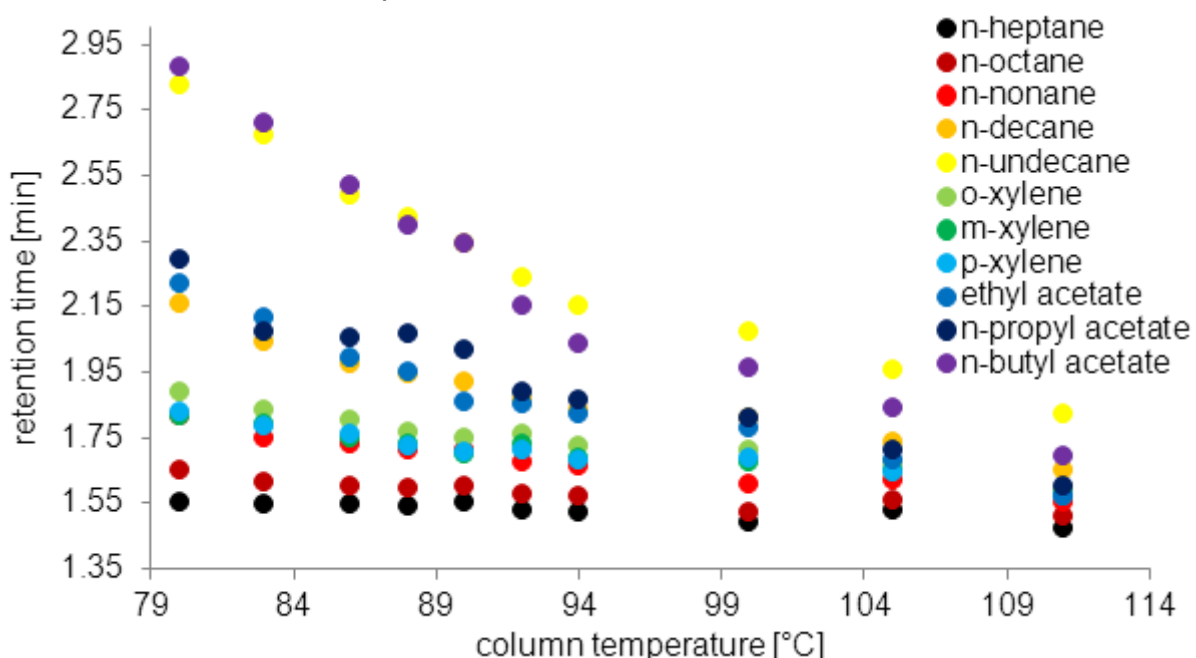


Figure 3. The variation of retention time with temperature for each testing substance.

The values of the specific retention volumes referred to 1 gram of the column filling are collated in Table 3 (P4 function). We can observe the commonly known chromatographic rules, that the higher the V_g value – the amount of carrier gas needed to elute the testing substance from the column bed grows and the increase of the column temperature causes a decrease of the parameter values, but around the transition temperature (i.e., 92 °C) the V_g values increase. It can be observed for xylenes and ethyl acetate, however, there is no such increase for other acetates, n-undecane, n-decane and n-nonane – it may be due to measurement errors or to the fact that the liquid crystal stationary phase interact with these substances.

Chromatographic study of the physicochemical and the separation properties of [4-(4-trans-ethylcyclohexanecarbonyl)oxyphenyl]4-(4-trans-propylcyclohexyl)benzoate

Table 3. The values of the specific retention volumes referred to 1 gram of the stationary phase.

testing substance	V_g [cm ³ /1g]				
	column temperature [°C]				
	80	83	86	88	90
n-heptane	0.933	1.020	0.880	0.954	1.294
n-octane	2.421	2.019	1.756	1.786	2.028
n-nonane	4.847	3.939	3.595	3.523	3.624
n-decane	9.764	8.338	7.230	6.903	6.727
n-undecane	19.594	17.559	14.845	13.935	12.998
ethyl acetate	10.718	9.303	7.465	7.045	5.826
n-propyl acetate	11.799	8.702	8.407	8.694	8.236
n-butyl acetate	20.394	18.023	15.259	13.623	13.046
p-xylene	4.975	4.494	4.021	3.652	3.507
m-xylene	4.807	4.582	3.898	3.764	3.470
o-xylene	5.846	5.254	4.692	4.327	4.210
	92	94	100	105	111
n-heptane	1.194	1.252	-0.160	0.850	0.522
n-octane	1.914	1.932	0.308	1.293	1.067
n-nonane	3.376	3.292	1.648	2.232	1.753
n-decane	6.131	5.855	4.427	3.898	3.189
n-undecane	11.655	10.679	8.259	7.082	5.791
ethyl acetate	6.013	5.642	3.977	3.096	2.024
n-propyl acetate	6.555	6.319	4.485	3.572	2.485
n-butyl acetate	10.348	8.799	6.691	5.430	3.887
p-xylene	3.831	3.600	2.670	2.584	2.012
m-xylene	4.072	3.633	2.552	2.638	2.107
o-xylene	4.576	4.251	3.001	3.005	2.306

The example of the $\ln V_g$ versus $1/T$ plots are depicted in Figure 4 (P4 function). It can be seen that $\ln V_g$ decreases with the increase of the column temperature. A significant increase of the $\ln V_g$ values is also observed – it means phase transition.

Chromatographic study of the physicochemical and the separation properties of [4-(4-trans-ethylcyclohexanecarbonyl)oxyphenyl]4-(4-trans-propylcyclohexyl)benzoate

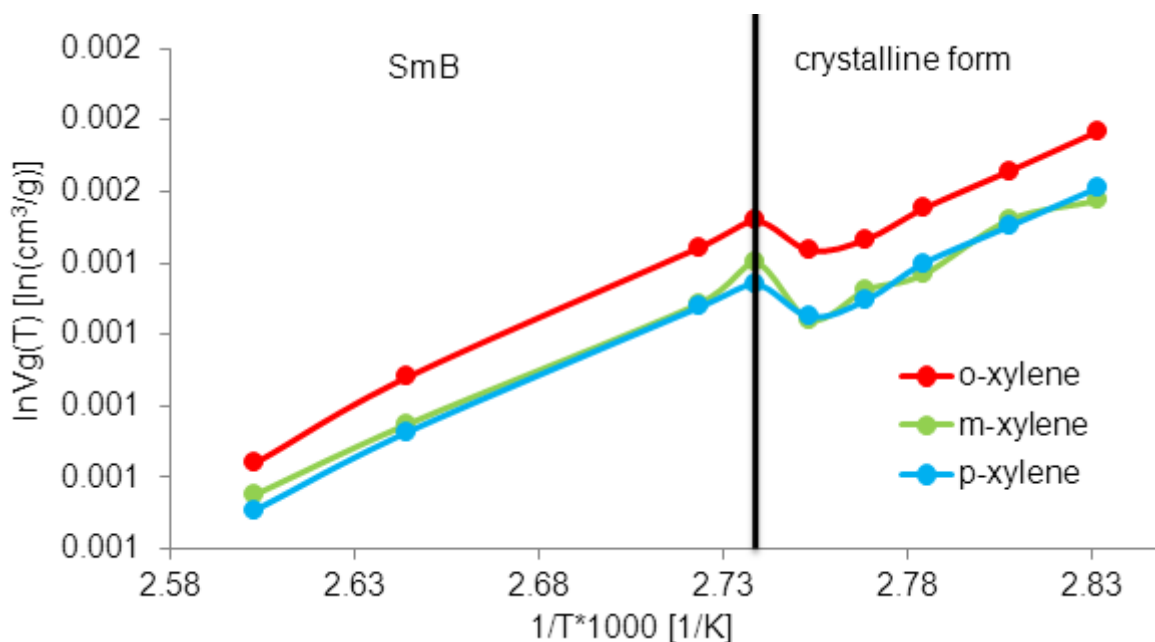


Figure 4. The plot of the $\ln V_g$ versus $1/T$.

The next step of the work was the determination of the values of the basic thermodynamic functions, i.e., the molar differential enthalpy of adsorption and dissolution and the molar differential entropy of adsorption and dissolution. The results are summarized in Table 4.

Table 4. The values of molar enthalpy and entropy of adsorption and dissolution calculated for the sets of peaks described by the P4 function.

testing substance	ΔH_A [kJ/mol]	ΔS_A [J/molK]	ΔH_S [kJ/mol]	ΔS_S [J/molK]
n-heptane	-20.430	-125.585	-60.831	-231.888
n-octane	-25.151	-139.929	-54.245	-183.467
n-nonane	-30.796	-144.118	-46.216	-174.340
n-decane	-36.270	-152.531	-45.140	-166.675
n-undecane	-48.850	-181.613	-35.444	-152.509
ethyl acetate	-71.428	-250.187	-72.804	-252.182
n-propyl acetate	-64.166	-215.914	-66.883	-235.172
n-butyl acetate	-54.277	-196.628	-58.720	-210.163
p-xylene	-42.451	-174.887	-42.531	-173.507
m-xylene	-44.312	-180.042	-40.170	-167.022
o-xylene	-38.305	-161.992	-44.553	-177.622

Table 4. The values of molar enthalpy and entropy of adsorption and dissolution calculated for the sets of peaks described by the P4 function.

Among xylenes the ortho-isomer is characterized by the highest values of enthalpy and entropy of adsorption and the lowest for dissolution. The para isomer

Chromatographic study of the physicochemical and the separation properties of [4-(4-trans-ethylcyclohexanecarbonyl)oxyphenyl]4-(4-trans-propylcyclohexyl)benzoate

has higher enthalpy and entropy values than the meta-isomer during the adsorption process. The dependency is reversed for dissolution. Probably this is due to the specific behavior of these isomers in the liquid-crystalline phase. Although p-xylene has a lower boiling point, its retention time is greater. Due to the elongated shape of the molecule, it interacts more with the liquid-crystalline stationary phase.

The increase in enthalpy and entropy of adsorption and dissolution with the increase in molecular weight of the acetates was observed. The enthalpy and entropy values for acetates are significantly different from those of the other testing compounds. This is probably due to the more extensive structure of the acetate molecules.

For the alkanes, the values of the enthalpy and entropy of adsorption decreases with increasing the carbon chain length. But the opposite sequence is observed the dissolving process.

4. Conclusions

Inverse gas chromatography is a very good method for determining the physicochemical properties of a substance used as a stationary phase and its interaction with testing substances. By the method, the basic thermodynamic quantities characterizing the interaction of liquid crystal molecules with testing substances are determined.

Two mathematical functions describing the profile of the chromatographic peaks, i.e., Exponentially-Modified Gaussian and Pearson IV were employed. Analyzing the values of the nonlinear correlation coefficients for the functions it is necessary to state that the second function more accurately describe the peak profiles.

According to the predictions, the increase of the column temperature causes the reduction of the retention time and reduces the specific retention volume, but the increase in molecular weight of testing substances causes the increase in the value of these parameters. Further studies should be continued.

CHARAKTERYSTYKA, WYSTĘPOWANIE I ANALIZA STEROLI ROŚLINNYCH

CHARACTERISTICS, EXPLORATION AND ANALYSIS OF PLANT STEROLS

Małgorzata Skarbek

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Katedra Chemii
ul. C. K. Norwida 25, 50-375 Wrocław
skarbek.gosia@gmail.com

Streszczenie

Fitosterole występują we wszystkich komórkach roślinnych i tworzą największą niezmydlającą część frakcji lipidowej. Sterole roślinne występują w formie wolnej lub czterech typów koniugatów, w tym estrów kwasów tłuszczowych lub kwasu hydroksycynamonowego, glikozydów i acylowanych glikozydów. Ze względu na obecność grup metylowych w pozycji C-4, wyróżnia się: 4-desmetylosterole, 4- α -metylosterole oraz 4,4-dimetylosterole. Najliczniejszą grupę steroli roślinnych stanowią 4-desmetylosterole, takie jak β -sitosterol, kampesterol czy stigmasterol. Fitosterole obniżają poziom frakcji LDL cholesterolu oraz wykazują działanie przeciwmiażdżycowe, przeciwzapalne i antyoksydacyjne.

Do ekstrakcji fitosteroli stosuje się najczęściej rozpuszczalniki organiczne takie jak heksan, aceton czy eter dietylowy. W celu analizy estrów i glikozydów steroli przeprowadza się ich hydrolizę. Do analizy fitosteroli wykorzystuje się chromatografię gazową - niezbędna jest wówczas ich derywatyzacja do lotnych pochodnych. Alternatywą jest wysokosprawną chromatografia cieczowa (HPLC) z detektorem wyładowań koronowych Corona CAD.

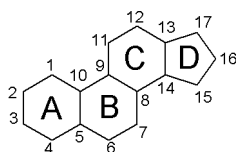
Abstract

Phytosterols are present in all plant cells and form the largest non-saponifying fraction of the lipid fraction. Plant sterols are present in the free form or four types of conjugates, including esters of fatty acids, esters of hydroxycinnamic acids, glycosides and acylated glycosides. Due to the presence of methyl groups in the C-4 position, 4-desmethyl steroids, 4- α -methyl steroids and 4,4-dimethyl steroids are distinguished. The most abundant group of plant sterols are 4-desmethyl steroids such as β -sitosterol, campesterol or stigmasterol. Their main advantage is lowering LDL cholesterol levels and anti-atherogenic, anti-inflammatory and antioxidant effects.

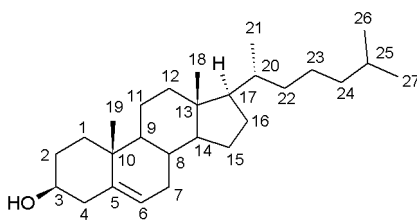
For the extraction of phytosterols most commonly organic solvents such as hexane, acetone or diethyl ether are used. Hydrolysis is performed to analyze esters and glycosides of sterols. For phytosterol analysis, gas chromatography is used - their derivatization is required for volatile derivatives. The alternative is High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with Corona CAD Corona Discharge Detector.

1. Wstęp

Fitosterole to grupa bioaktywnych substancji występujących naturalnie w błonach komórkowych roślin. Sterole roślinne zaliczane są do triterpenów. Wywodzą się one z cykloartenolu, którego podstawową strukturą jest pierścień steranu, czyli cyklopentanoperhydrofenantrenu (Schemat 1).^{1,2} Sterole roślinne to 28- lub 29-węglowe alkohole mające taki sam układ wielopierścieniowy jak cholesterol (Schemat 2), ale różniących się od niego łańcuchem bocznym. W przyrodzie sterole można znaleźć w formie wolnej lub czterech typów koniugatów, w tym estrów kwasów tłuszczowych lub kwasu *p*-hydroksycynamonowego, glikozydów (najczęściej glukozydów) i acylowanych glikozydów (Schemat 3).³



Schemat 1. Struktura steranu.



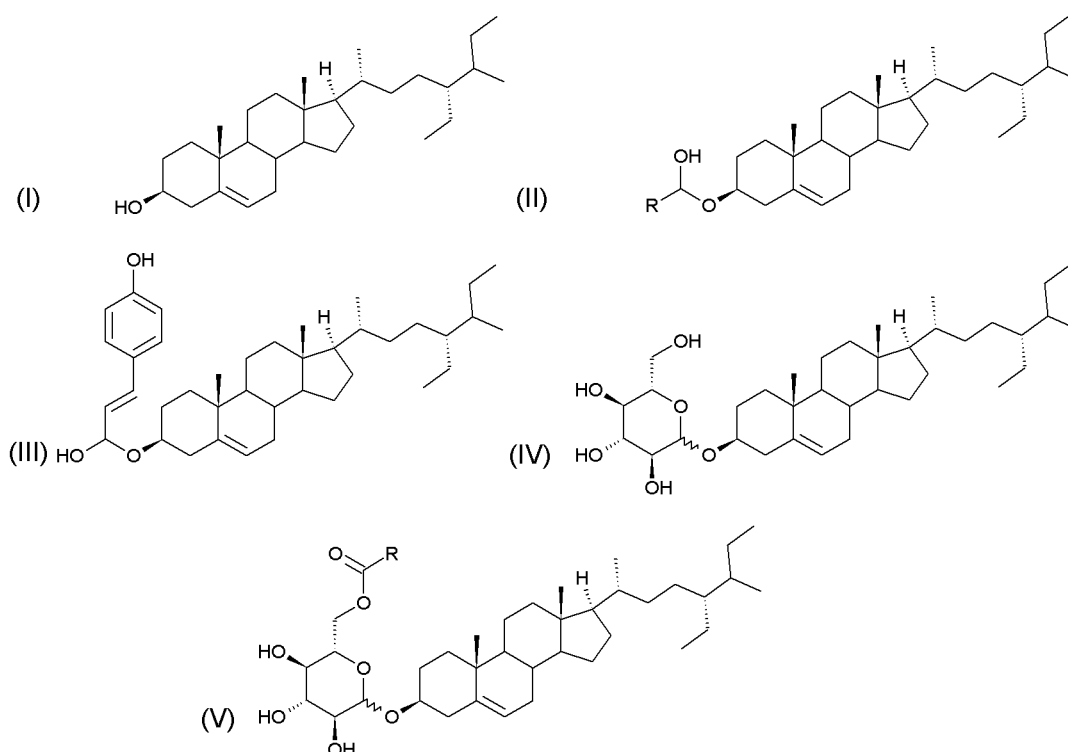
Schemat 2. Wzór cholesterolu

¹ J. Przysławski, *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*: XLII, 2009, 1, 1-9.

² M. Drzewicka, *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*: XLIV, 2011, 4, 1029-1033.

³ M. J. Lagarda, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, 41, 1486-1496.

Charakterystyka, występowanie i analiza steroli roślinnych



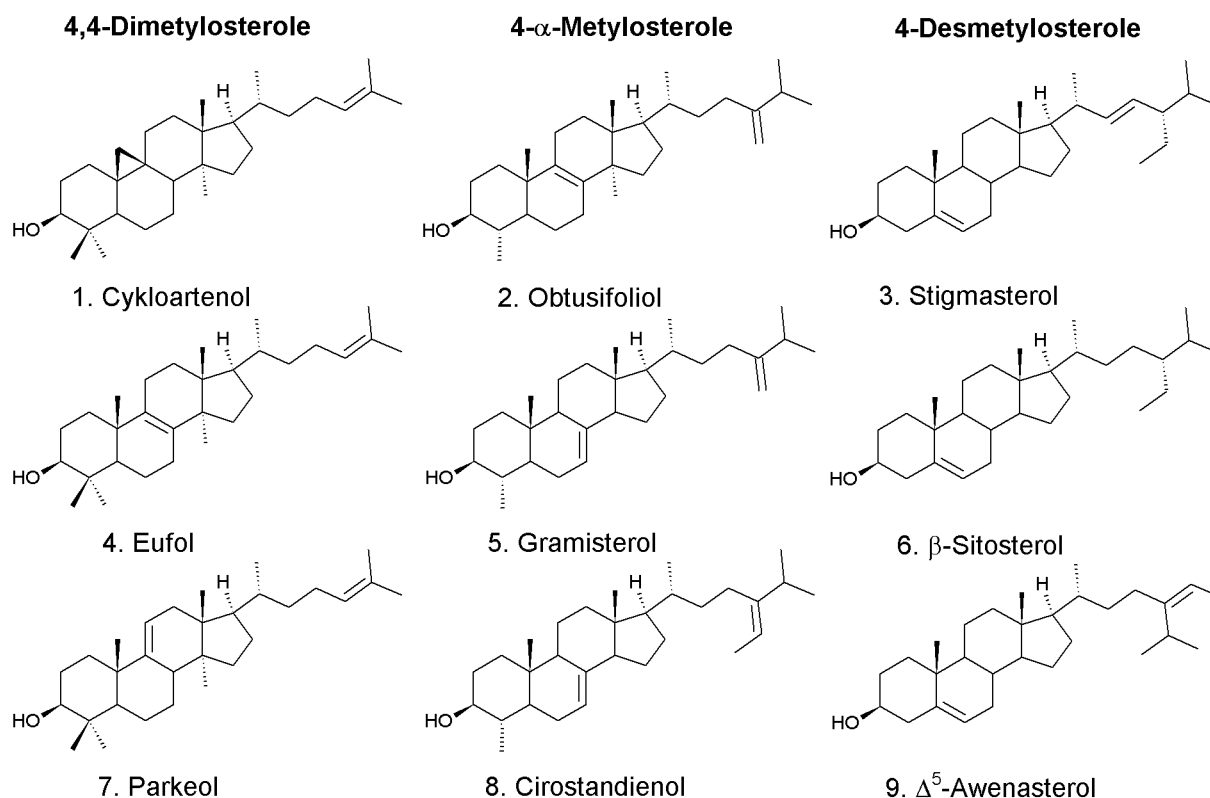
Schemat 3. Formy występowania fitosteroli na przykładzie β -sitosterolu: (I) wolny fitosterol, (II) ester kwasu tłuszczowego (R – reszta kwasu tłuszczowego), (III) ester kwasu *p*-hydroksycynamonowego, (IV) glukozyd, (V) acylowany glukozyd (R – reszta kwasu tłuszczowego).

U roślin zidentyfikowano ponad 200 różnych struktur steroli.⁴ Jeden z podziałów fitosteroli uwzględnia obecność grup metylowych w pozycji C-4. Według tego podziału wyróżnia się: 4-desmetylosterole, 4- α -metylosterole oraz 4,4-dimetylosterole (Schemat 4). Najliczniejszą grupę steroli roślinnych stanowią 4-desmetylosterole, takie jak β -sitosterol, kampesterol, stigmasterol, ergosterol, Δ^5 -awenasterol i Δ^7 -awenasterol. β -Sitosterol jest dominującym steroidem w tkankach roślinnych (90%).³

Kolejny podział uwzględnia obecność wiązania podwójnego w cząsteczce. Pierwszą grupę stanowią Δ^5 -sterole, zawierające wiązanie podwójne pomiędzy 5 a 6 atomem węgla w cząsteczce. Drugą grupę stanowią Δ^7 -sterole z wiązaniem podwójnym pomiędzy 7 a 8 atomem węgla, które rzadziej występują w przyrodzie. Natomiast trzecią grupą są nasycone fitosterole, czyli stanole, bez podwójnego wiązania w cząsteczce.³

⁴ Md. S. Uddin, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2014, 95:7, 1385-1394.

Charakterystyka, występowanie i analiza steroli roślinnych



Schemat 4. Przykłady struktur steroli roślinnych: 4,4-dimetylosterole (1. Cykloartenol, 4. Eufol, 7. Parkeol), 4- α -metylosterole (12. Obtusifoliol, 5. Grami sterol, 8. Cirostandienol), 4-desmetylosterole (3. Sigma sterol, 6. β -stigmasterol, 9. Δ^5 -awenasterol).

Fitosterole występują we wszystkich komórkach roślinnych. Tworzą największą niezmydlającą część frakcji lipidowej. Do najważniejszych źródeł steroli roślinnych w diecie człowieka należą: nasiona roślin oleistych oraz otrzymywane z nich oleje i margaryny, rośliny strączkowe oraz orzechy. W mniejszych ilościach można znaleźć je w warzywach i owocach. Zestawienie źródeł fitosteroli prezentuje Tabela 1.^{5,6}

Tabela 1. Zawartość steroli w wybranych produktach.^{5,6}

Źródło fitosteroli	Zawartość steroli (mg/100 g)
Otręby ryżowe	1190
Olej kukurydziany	968
Olej słonecznikowy	725
Olej sojowy	221
Oliwa z oliwek	221
Migdały	143
Salata	38
Figa	31
Banan	13

⁵ S. L. Abidi, *Journal of Chromatography*, 2001, A: 935, 173-201.

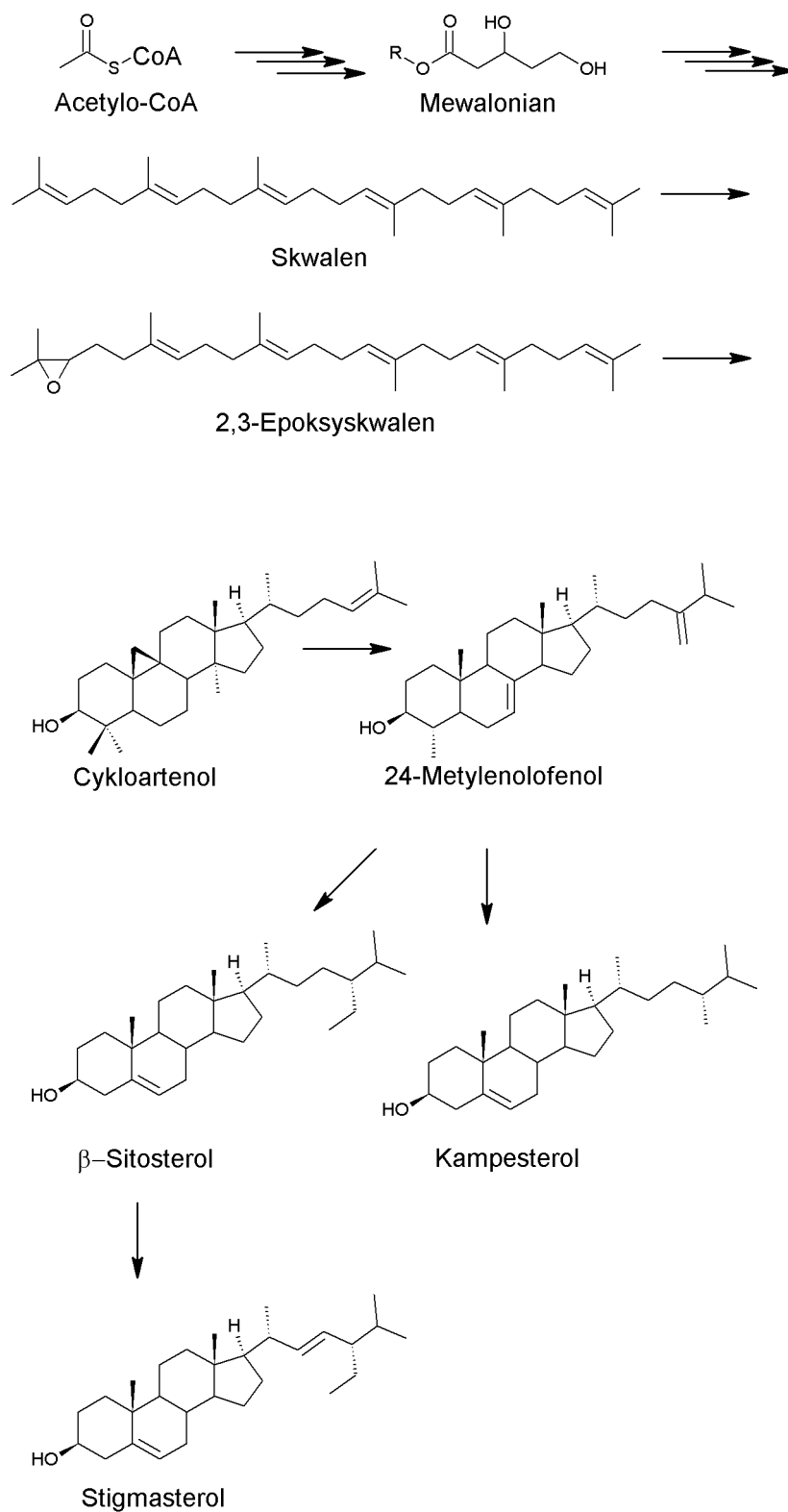
⁶ A. Kopeć, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*: 18, 2010, 3, 5-14.

2. Biosynteza steroli w tkankach roślinnych

Sterole roślinne mają budowę izoprenoidową a ich biosynteza odbywa się na dwóch ścieżkach: deoksyksylulozowej (4-fosforanu 2-C-metylo-D-erytrytolu, z ang. MEP – Methylerythritol Phosphate Pathway) lub mewalonianowej (z ang. MVA - Mevalonic Acid). Szlak mewalonianowy jest zlokalizowany w cytozolu, retikulum endoplazmatycznym oraz w peroksysomach, natomiast szlak MEP przebiega w plastydach. Ścieżka MVA jest specyficzna dla fitosteroli i głównie tą drogą są one syntezowane. W biosyntezie fitosteroli wyróżnia się dwa etapy: 1) ścieżkę MVA oraz 2) szlak enzymatyczny, który jest charakterystyczny dla wszystkich steroli.⁷ Początkowo acetylo-CoA przekształcany jest do mewalonianu, z którego w kolejnych etapach powstaje skwalen utleniany następnie do 2,3-epoksyskwalenu. Etapy te są analogiczne do biosyntezy steroli zwierzęcych. Różnice w biosyntezie steroli między roślinami wyższymi i zwierzętami mają miejsce na etapie cyklizacji 2,3-epoksyskwalenu. Etap, który jest specyficzny dla roślin to cyklizacja 2,3-epoksyskwalenu do cykloartenolu. To kluczowe przekształcenie, dzięki któremu w dalszych modyfikacjach powstają fitosterole. W dalszym etapie, do cykloartenolu w pozycji C-24 wprowadzane są grupy metylowe, etylowe oraz metylenowe w efekcie czego powstają: 24-metylenolofenol, β -sitosterol czy kampesterol. Dalsze modyfikacje tych triperpenów prowadzą do otrzymania konkretnych fitosteroli w reakcjach utleniania, redukcji i demetylacji.⁴

⁷ J. Feldman, *Doctoral thesis*, Washington State University, 2012.

Charakterystyka, występowanie i analiza steroli roślinnych



Schemat 5. Biosynteza głównych fitosteroli na szlaku MVA.⁴

3. Najważniejsze funkcje biologiczne fitosteroli i ich zastosowanie

Sterole roślinne znane są przede wszystkim ze swoich prozdrowotnych właściwości. Związki te obniżają poziom frakcji LDL cholesterolu (lipoprotein

o małej gęstości), obniżając tym samym całkowity poziom cholesterolu we krwi.⁸ Powodują hamowanie absorpcji endogennego oraz egzogenego cholesterolu. Sterole roślinne dostarczone z pożywieniem są emulgowane razem z cholesterolem i innymi lipidami przez sole żółciowe, a następnie wydzielane są do jelita cienkiego w postaci miceli. W micelach wypierają one cholesterol, ponieważ są bardziej hydrofobowe. Zestryfikowane formy fitosteroli są hydrolizowane do wolnych steroli przez esterazy cholesterolu i lipazy trzustki. Rozpuszczone wolne oraz zestryfikowane sterole roślinne posiadają podobną aktywność obniżania poziomu cholesterolu we krwi. Należy podkreślić, że stanole roślinne wykazują wyższą aktywność redukcji poziomu cholesterolu we krwi niż sterole. Stanole biotransformowane są przez bakterie mikroflory jelitowej do koprosterolu i koprostanonu.⁹

Korzystny wpływ na zmniejszenie stężenia LDL cholesterolu przez fitosterole doprowadziło do wielu badań nad tymi związkami. β -Sitosterol jest stosowany, od 1950 jako dodatek do żywności oraz jako lek obniżający stężenie cholesterolu w surowicy krwi u osób z hipercholesterolemią.²

Przeciętne dzienne spożycie fitostanoli wynosi 20 - 50 mg oraz 100 - 350 mg w przypadku fitosteroli w diecie. Minimalna ilość fitosteroli wykazująca efekt hipcholesterolemiczny to 1000 mg na dzień. Spożycie ok. 2 g steroli i stanoli roślinnych w codziennej diecie pozwala obniżyć wchłanianie cholesterolu o ok. 60%.^[6,10] W badaniach na zwierzętach potwierdzono ich właściwości przeciwnowotworowe (zahamowanie rozwoju raka okrężnicy, płuc, żołądka, jajnika oraz raka piersi) przez apoptozę komórek rakowych. Wykazują one również właściwości przeciwmiażdżycowe, przeciwzapalne i antyoksydacyjne.¹⁰

Nadmierne spożywanie fitosteroli może spowodować różne efekty uboczne, dlatego zaleca się ich spożywanie do 3 g/dobę. Sterole roślinne stosowane jako dodatki do żywności (m.in. w margarynach) nie są polecane dla dzieci poniżej piątego roku życia, które mają prawidłowe stężenie cholesterolu we krwi. Mogą wystąpić u nich zakłócenia wchłaniania witamin rozpuszczalnych w tłuszczach. Zapotrzebowanie u dzieci na cholesterol jest zwiększone, a niedostarczenie odpowiedniej dawki steroli może prowadzić do zaburzenia gospodarki lipidowej oraz miażdżycopochodnych chorób układu krążenia w wieku starszym. Ponadto, nadmierne spożywanie fitosteroli może niekorzystnie wpływać na poziom β -karotenu w organizmie człowieka, a także obniżyć poziom likopenu i witaminy E. Zbyt wysoki poziom fitosteroli redukuje stężenie β -karotenu we krwi o około 25%, a w przypadku witaminy E o 8%. Wykazano, iż dawka 1,5 g/dobę fitosteroli skutecznie obniża poziom cholesterolu i nie wpływa na obniżenie karotenoidów i witaminy E w osoczu krwi.⁶

⁸ M. D. Patel, *Atherosclerosis*, 2006, 186, 12-19.

⁹ S. B. Racette, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2010, 91, 32-38.

¹⁰ T. A. Woyengo, *Journal of Clinical Nutrition*, 2009, 63, 813-820.

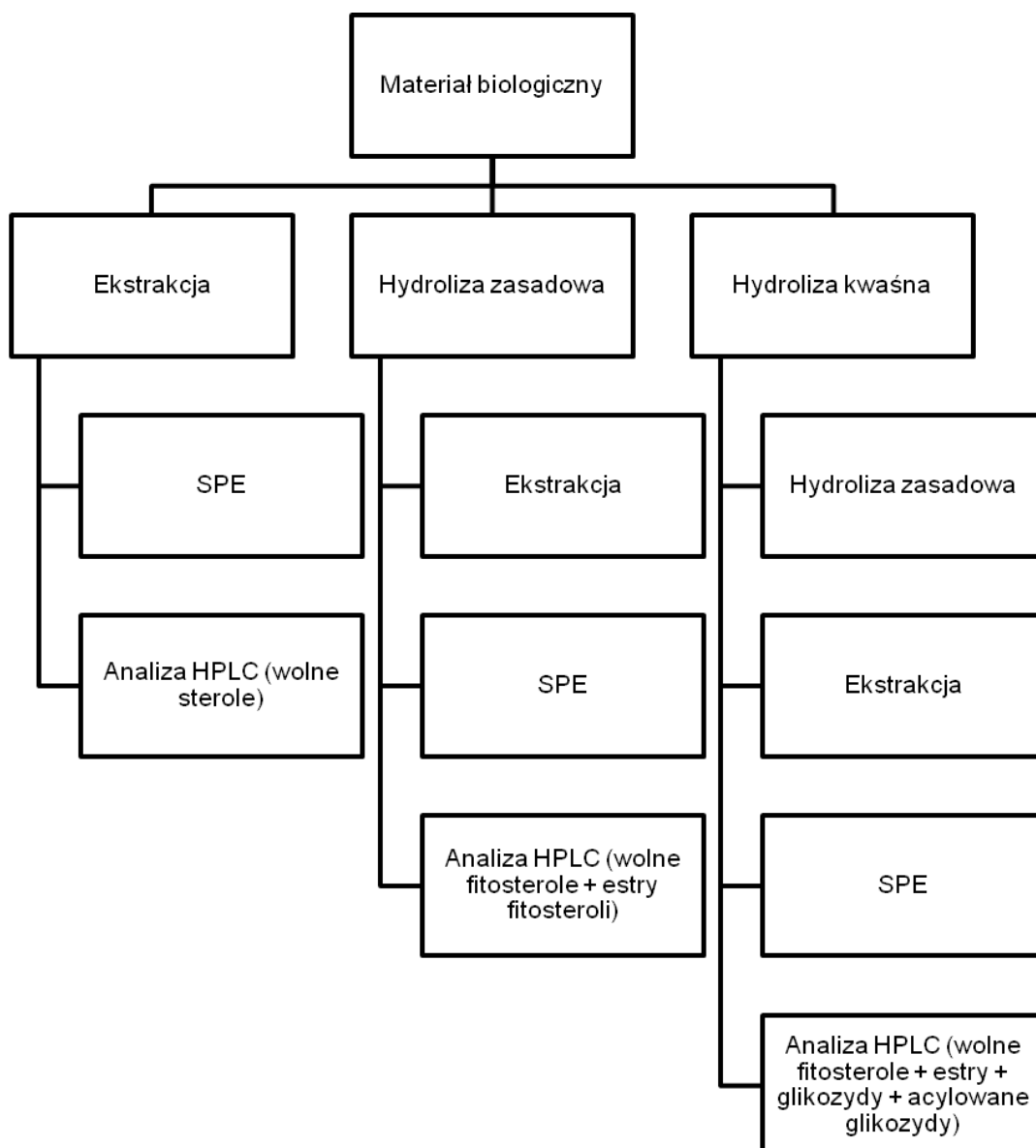
4. Izolowanie fitosteroli

Dobór techniki izolowania fitosteroli zależy od stanu fizycznego próbki (ciekły lub stały), a także formy ich występowania (wolne, zestryfikowane lub glikozydy). Fitosterole z tkanek i olejów roślinnych można wydzielić przez ekstrakcję rozpuszczalnikami organicznymi takimi jak heksan, chlorek metylenu, aceton, odczynnik Folcha (chloroform: metanol, 2:1, v/v) lub mieszaniną chloroformu, metanolu i wody.^{5,3}

Alternatywną metodą izolowania fitosteroli jest zastosowanie ekstrakcji cieczą w stanie nadkrytycznym (z ang. SFE – Supercritical Fluid Extraction). Stosowana jest ona w przypadku próbek w stanie stałym. Zaletą stosowania SFE jest wysoka selektywność, krótki czas ekstrakcji i wysoka czystość otrzymanego produktu. Płyn w stanie nadkrytycznym posiada zarówno cechy cieczy, jak i gazu. Najczęściej do ekstrakcji związków biologicznie czynnych stosuje się dwutlenek węgla w stanie nadkrytycznym, ponieważ jest on bezwonny, bezbarwny, niepalny, nietoksyczny, obojętny w stosunku do większości materiałów, bezpieczny, niedrogi i może być stosowany w łagodnych warunkach (temperatura krytyczna 31,1°C; ciśnienie krytyczne 7,38 MPa). Dwutlenek węgla w stanie nadkrytycznym jest stosowany jako rozpuszczalnik w ponad 90% przypadków ekstrakcji SFE.⁴

Tak jak wcześniej wspomniano fitosterole występują w postaci wolnej lub czterech typów koniugatów. Hydroliza steroli roślinnych (zmydlanie) jest przeprowadzana w celu uzyskania wolnej formy tych związków z ekstraktów lipidowych. W procesie zasadowej hydrolizy otrzymuje się wolne sterole roślinne oraz sole kwasów. Wyróżnia się zmydlanie na zimno i na gorąco. W obu przypadkach reakcję prowadzi się z zastosowaniem wodorotlenku sodu lub potasu w 95% metanolu bądź etanolu. Glikozydy i acylowane glikozydy fitosteroli nie ulegają hydrolizie w warunkach zasadowych. Do uzyskania wolnych steroli roślinnych z glikozydów lub acylowanych glikozydów konieczne jest zastosowanie hydrolizy w środowisku kwaśnym. Przeprowadza się ją w metanолоwym roztworze kwasu solnego.¹¹ Zestawienie metod analizy fitosteroli przedstawia Schemat 6.

¹¹ S. Feng, *Food Chemistry*, 2015, 181, 9-14.



Schemat 6. Metody analizy wolnych fitosteroli, ich estrów i glikozydów.¹¹

Do rozdzielania wybranych klas steroli (wolne i koniugaty) i grup strukturalnych (4,4-dimetylosterole, 4- α -metylosterole i 4-desmetylosterole) stosuje się chromatografię kolunową. Adsorpcja wolnych steroli przy użyciu chromatografii w układzie faz stacjonarnych polega na oddziaływaniu z atomem wodoru i dipolami, w interakcji między grupą 3- β -hydroksylową a fazą stacjonarną np. żelom krzemionkowym. Mieszaninę fitosteroli różniących się podstawieniem w pozycji C-4, wymywa się z kolumny adsorpcyjnej w kolejności: 4,4-dimetylosterole, 4- α -metylosterole oraz 4-desmetylosterole. Niektóre różnice w polarności są widoczne między związkami zawierającymi grupę hydroksylową w pozycji 3- β (bardziej polarne) i 3- α (mniej polarne) oraz w przypadku 5- α -hydroksystanoli (bardziej polarne) i 5- β -hydroksystanoli (mniej polarne). Obecność wiązania estrowego znacznie redukuje polarność cząsteczki - estry steroli eluowane są z kolumny o wiele szybciej niż wolne sterole. Inne koniugaty steroli (np. acylowane

glikozydy steroli i glikozydy steroli) ze względu na wyższą polarność wykazują znacznie większe powinowactwo do żelu krzemionkowego niż wolne fitosterole.

Chromatografię kolumnową stosuje się zazwyczaj do oddzielania większych ilości lipidów (>250mg). Najczęściej stosowane materiały adsorpcyjne to żel krzemionkowy i tlenek glinu. Chromatografię kolumnową na tlenku glinu stosuje się do rozdzielania acylowanych glikozydów steroli, glikozydów steroli, estrów kwasu ferulowego oraz siarczanów steroli. Rozpuszczalniki używane do elucji tych związków to mieszaniny heksanu z eterem dietylowym, heksanu z octanem etylu lub mieszanina chloroformu i metanolu.¹²

Chromatografia cienkowarstwowa (z ang. TLC - Thin Layer Chromatography) na żelu krzemionkowym jest stosowana zarówno dla metod analitycznych jak i preparatywnych. Preparatywną chromatografię cienkowarstwową (pTLC) stosuje się do ilości lipidów poniżej 200 mg. Dzięki procesowi adsorpcji na płytkach TLC z żelem krzemionkowym można rozdzielić różne rodzaje steroli na podstawie ich polarności.

Wizualizacja płytek odbywa się przez rozpylanie na płytkę 50% kwasu siarkowego) lub 80% dichromianu potasu w kwasie siarkowym etanolu lub za pomocą lampy UV (na płytce TLC z żelem krzemionkowym ze wskaźnikiem fluorescencyjnym, np. dichlorofluoresceiną). Technika ta jest odpowiednia do oczyszczania próbki oraz do wstępnych testów jakościowych i określenia zawartości steroli.³

Ekstrakcja do fazy stałej (z ang. SPE - Solid Phase Extraction) to obecnie najbardziej popularna metoda przygotowania prób frakcji lipidowych do analiz. SPE umożliwia oczyszczenie i koncentrację próbki oraz izolowanie wybranych analitów. W pierwszym etapie odbywa się kondycjonowanie kolumny, które jest przeprowadzane przed wyeluowaniem analitów właściwym strumieniem eluentu i służy do aktywowania złoża. Po naniesieniu próbki na fazę stałą przeprowadza się elucję. W oczyszczaniu istotny jest dobór odpowiedniego sorbentu, eluentu oraz właściwe przygotowanie złoża. Ważnym aspektem w ekstrakcji SPE jest dobór wypełnienia kolumny.¹³

5. Metody analizy fitosteroli

Chromatografia gazowa (z ang. GC - Gas Chromatography) to jedna z najpopularniejszych metod instrumentalnych analizy fitosteroli. Fazę stacjonarną stanowi np. dimetylopolisiloksan (100%) lub fenyloдимetylopolisiloksan (5% difenylo - 95% dimetylopolisiloksan), natomiast fazę ruchomą stanowi gaz nośny np. wodór, azot, hel. Najczęściej używanym detektorem w chromatografii gazowej jest detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID). Detektor FID jest selektywny i czuły na substancje ulegające jonizacji w płomieniu powietrza i gazu nośnego. Do jego zalet można zaliczyć uniwersalność, łatwość obsługi, niski koszt i dobrą czułość detekcji (0,1-10 ng). Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią masową GC-MS służy do identyfikacji strukturalnej i ilościowej badanych związków.

¹² L. Goad, *Analysis of Sterols*, 1997.

¹³ F. Poole, *Trends in Analytical Chemistry*: 22, 2003, 6, 362-373.

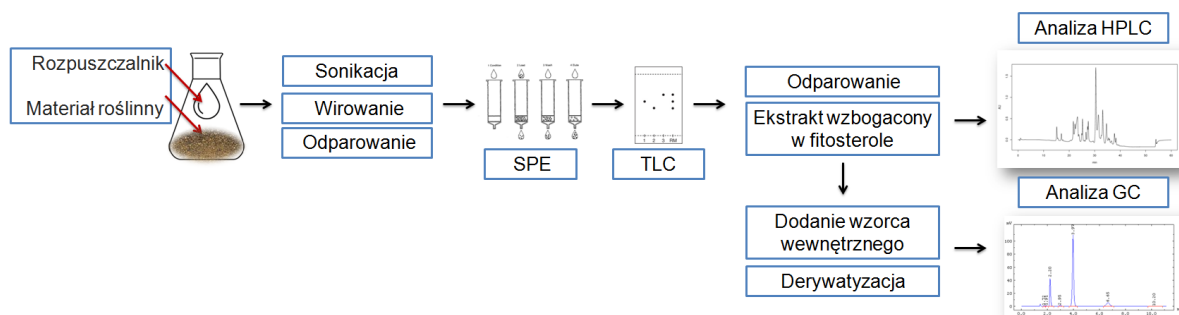
Charakterystyka, występowanie i analiza steroli roślinnych

Aby zidentyfikować fitosterole za pomocą GC (FID) w ekstrakcie lipidowym przeprowadza się ich derywatyzację. Istnieje wiele metod przeprowadzania badanych substancji w lotne pochodne, a w przypadku fitosteroli stosuje się alkilowanie np. za pomocą *N,O*-bis-(trimetylosililo)trifluoroacetamidu (BSTFA). Odczynnik ten blokuje grupy hydroksylowe. Derywatyżacja pozwala na przekształcanie związków w lotne pochodne oraz zwiększa czułość detekcji analizowanych związków. W analizie ilościowej fitosteroli stosuje się wzorzec wewnętrzny. Najczęściej wykorzystuje się 5- α -cholestan, 5- α -cholestan-3- β -ol oraz cholesterol.¹⁴

Dobłą alternatywą analizy fitosteroli jest wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC, z ang. - High Performance Liquid Chromatography) z zastosowaniem detektora wyładowań koronowych Corona CAD. Chromatografia cieczowa z użyciem tego detektora umożliwia wykrycie nielotnych i dość nietrwałych związków sterolowych. W przeciwieństwie do chromatografii gazowej, analizowane związki nie muszą być poddawane derywatyżacji. W analizie steroli roślinnych wykorzystuje się kolumnę HPLC w odwróconym układzie faz (RP-HPLC – z ang. Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography), gdzie fazę ruchomą stanowią bardziej polarne i lotne rozpuszczalniki od mniej polarnej fazy stacjonarnej.³

Najczęściej używanym detektorem w chromatografii cieczowej jest detektor UV-VIS, który do wykrycia związku wymaga obecności grup chromoforowych, natomiast uniwersalny detektor CAD wykrywa związki niezależnie od ich budowy chemicznej i umożliwia oznaczenie wybranych związków w warunkach nebulizacji (temperatura pokojowa i ciśnienie atmosferyczne). Cechuje się on wysoką czułością, szerokim zakresem pomiarowym oraz powtarzalnością wyników. W przeciwieństwie do detektora UV-VIS nie wymaga obecności grup chromoforowych.^{15,16}

Przykładowa analiza pozyskiwania steroli roślinnych została przedstawiona na Schemacie 7.



Schemat 7. Przykładowy schemat analizy fitosteroli.

¹⁴ M. dos Santos, *Austin Chromatography*:1, 2014, 5, 1-4.

¹⁵ R. Bachorz, *Sprzęt i aparatura laboratoryjna. Laboratorium*, 2010, 7-8.

¹⁶ I. Acwoth, *Thermo Fisher Scientific. Chelmsford*, 2001.

6. Podsumowanie

Fitosterole ze względu na swoje prozdrowotne właściwości, szczególnie przez korzystny wpływ na metabolizm cholesterolu w całym organizmie są pożądane w codziennej diecie. Związki te wykazują działanie przeciwnowotworowe i antyoksydacyjne co czyni je ciekawym obiektem badań. Nie są one syntetyzowane przez człowieka, dlatego muszą być dostarczane wraz z pożywieniem. Na przestrzeni ostatnich lat wzrasta zainteresowanie zawartością fitosteroli w żywności, również jako dodatków do żywności czy suplementów diety. Przyszłe badania będą kluczowe, aby szczegółowo wyjaśnić prozdrowotne właściwości fitosteroli. Powyżej omówiono różne etapy oznaczania steroli roślinnych, gdzie istotnym elementem jest dobór odpowiedniej metody oznaczania fitosteroli w żywności. Dostępne techniki analizy steroli roślinnych w zależności od ich czułości i dokładności to GC oraz HPLC. Z drugiej strony konieczne jest opracowanie szybszych procedur ułatwiających kontrolę funkcjonalnej żywności z dodatkiem fitosteroli.

**CLINICAL APPLICATIONS OF SILVER AND GOLD NANOPARTICLES.
BENEFITS AND THREATS. A REVIEW.**

**KLINICZNE ZASTOSOWANIE NANOCZĄSTEK SREBRA I ŻŁOTA.
KORZYŚCI I ZAGROŻENIA.**

**Karol P. Steckiewicz¹, Ewelina Zielińska¹, Michał Woźniak¹,
Iwona Inkielewicz – Stępnia¹**

¹Gdański Uniwersytet Medyczny, Wydział Lekarski, SKN przy Katedrze Chemii Medycznej
Dębinki, 1, 80-211, Gdańsk
karol.steckiewicz@gumed.edu.pl

Abstract

Due to the fast development of nanotechnology in the 21st century, nanoparticles (NPs) have a wide range of application. They are used in biology, industry, and medicine.¹ Size, shape and functionalization of NPs have the impact of their biological properties and usage.² Growing market position of nanotechnology products forces needs to evaluate their toxicity. Selected, possible benefits and threats of medical application of silver nanoparticles (AgNPs) and gold nanoparticles (AuNPs) will be pointed out in this article. AgNPs act against bacteria, fungus, and viruses.^{1,3-5} AgNPs may also be a prospective therapeutic agent for biofilm.^{6,7} Unfortunately, AgNPs are not free of toxicity. Decreasing cell viability, reactive oxygen species generation, DNA damage, and inhibition of enzymatic properties of proteins are observed after exposure of AgNPs.⁸⁻¹¹ Parenteral administration of AgNPs rats causes liver and spleen enlargement and weight loss in rats.¹² AuNPs are used for diagnostic of cancer, cell imaging, and drug delivery.^{13,14} However, AuNPs decrease the viability of adipocytes and osteosarcoma cells.^{15,16} AuNPs also impair wound healing and causes weight loss in animals.^{15,17} AuNPs could accumulate in the brain.^{17,18} The impact of AuNPs depends on animals sex.¹⁸

Streszczenie

Dzięki rozwojowi nanotechnologii, nanocząstki (NPs) znalazły zastosowanie w wielu dziedzinach życia m.in. naukach biologicznych, przemyśle i medycynie.¹ Na ich właściwości biologiczne i zastosowanie wpływa wielkość, kształt i funkcjonalizacja.² Rosnąca rola nanotechnologii wymusza dokładną ocenę toksyczności NPs. W artykule zostały przedstawione korzyści i zagrożenia wynikające ze stosowania nanocząstek srebra (AgNPs) i złota (AuNPs) w medycynie i naukach pokrewnych. Ponieważ AgNPs działają bakteriobójczo, grzybobójczo oraz wirusobójczo mogą mieć zastosowanie medyczne.^{1,3-5}

¹ K. Niska, N. Knap, A. Kędzia, M. Jaskiewicz, W. Kamysz, I. Inkielewicz-Stępnia, *Int. J. Med. Sci.*, 2016, 13, 772–782.

² M. Rai, A. P. Ingle, S. Birla, A. Yadav, C. A. Dos Santos, *Crit. Rev. Microbiol.*, 2015, 0, 1–24.

³ C. A. Dos Santos, M. M. Seckler, A. P. Ingle, I. Gupta, S. Galdiero, M. Galdiero, A. Gade, M. Rai, *J. Pharm. Sci.*, 2014, 103, 1931–1944.

⁴ M. Selvaraj, P. Pandurangan, N. Ramasami, S. B. Rajendran, S. N. Sangilimuthu, P. Perumal, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2014, 173, 55–66.

AgNPs są również wykorzystywane do zwalczaniu biofilmu bakteryjnego.^{6,7} Molekularne mechanizmy cytotoksycznego działania nanocząstek są prawdopodobnie związane z generowaniem reaktywnych form tlenu, uszkodzeniem DNA oraz hamowaniem właściwości enzymatycznych białek komórkowych.^{8–11} U szczurów po dożylnym podaniu AgNPs zauważono powiększenie wątroby i śledziony oraz utratę masy ciała.¹² AuNPs są używane w diagnostyce onkologicznej, obrazowaniu komórek oraz jako nośniki leków.^{13,14} Wykazano że AuNPs obniżają żywotność adipocytów i komórek kostniakomięsaka.^{15,16} W badaniach *in vivo* udowodniono, że AuNPs utrudniają gojenie się ran oraz powodują utratę masy ciała.^{15,17} Wykazano również, akumulację AuNPs w mózgu.^{17,18} Co więcej, stopień nasilenia efektów toksycznych zależał od płci zwierzęcia.¹⁸

1. Introduction

Nano-products are thought to have countless applications and enormous potential. Nanoparticles (NPs) are the type of nano-products which have each dimension between 1nm and 100nm.¹ A unique property of NPs is high surface area to volume proportion and ability to penetrate through cellular membranes and structural barrier, which are main reasons of multiple NPs application.² NPs are used in biology, genetic engineering, medicine, biotechnology, and industry.^{2,3,4} A wide range of potential functionalization extends their deployment.² To be motioned, peptides antibodies or nucleic acids may be attached to NPs.² Nobel metal nanoparticles have a wide range of biological application.² Thus, it is especially important to assess negative aspects of acting NPs in the human body. Concurrent development of nanotechnology and nanotoxicology, will not only define the application of NPs, but it will point possible threats. If we evaluate NPs cytotoxicity we will probably be able to prevent it.

The aim of this review is, to sum up, selected properties of silver nanoparticles (AgNPs) and gold nanoparticles (AuNPs), which may be useful from the clinical point of view. In the article, we also emphasize possible threats of applying those nanoparticles. Size and functionalization of NPs were taken in concern.

2. Biomedical application of silver and gold nanoparticles

AgNPs have well-documented antimicrobial properties.^{1,5–8} This effect was related to the type of bacteria cells, incubation time and size of AgNPs.^{1,3,9} It is proven that AgNPs exhibit cytotoxic activity against many bacterial strains such as

⁵ O. Brandt, M. Mildner, A. E. Egger, M. Groessler, U. Rix, M. Posch, B. K. Keppler, C. Strupp, B. Mueller, G. Stingl, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, 2012, 8, 478–488.

⁶ P. Singh, Y. J. Kim, H. Singh, C. Wang, K. H. Hwang, M. E. A. Farh, D. C. Yang, *Int. J. Nanomedicine*, 2015, 10, 2567–2577.

⁷ J. Junevi, J. Žilinskas, K. Č. D. Gleiznys, *Stomatol. Balt. Dent. Maxillofac. J.*, 2015, 17, 9–12.

⁸ K. Williams, L. Valencia, K. Gokulan, R. Trbojevich, S. Khare, *Food Chem. Toxicol.*, 2017, 100, 197–206.

⁹ K. Markowska, A. M. Grudniak, K. I. Wolska, *Acta Biochim. Pol.*, 2013, 60, 523–530.

¹⁰ S. Mohanty, S. Mishra, P. Jena, B. Jacob, B. Sarkar, A. Sonawane, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, 2012, 8, 916–924.

¹¹ G. Franci, A. Falanga, S. Galdiero, L. Palomba, M. Rai, G. Morelli, M. Galdiero, *Molecules*, 2015, 20, 8856–8874.

**CLINICAL APPLICATIONS OF SILVER AND GOLD NANOPARTICLES.
BENEFITS AND THREATS. A REVIEW.**

Escherichia coli, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella mobilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholera* and *Mycobacterium tuberculosis*.^{3,10,11} Some researchers have proven that AgNPs exerts its effect even on drug-resistant bacterial strains.^{5,10} Bacteria are unlikely to develop resistance to AgNPs, especially when they are combined with antibiotics.³ It is important because drug – resistant strains increase severity and mortality of bacterial infections.¹¹ Niska et al. have shown that 10 nm AgNPs inhibits the growth bacteria on the reference strains and patients' isolated bacterial strains.¹ Growth inhibition was observed in 70% of bacterial strains, the level of growth inhibition was 55% on gram-negative (e.g. *Porphyromonas* sp., *Prevotella* sp., *Bacteroides* sp., *Fusobacterium* sp.) strains and all tested gram-positive strains (e.g. *Peptostreptococcus* sp., *Bifidobacterium* sp., *Propionibacterium* sp.) were susceptible to AgNPs¹. This effect may be increased by functionalisation of AgNPs.^{1,9} Uncapped AgNPs and lipoic acid functionalised AgNPs have the strongest antimicrobial effect.¹ Mechanism of AgNPs cytotoxicity is unclear. However, nowadays several effects of AgNPs in cells are thought to cause cytotoxicity. Kim et al. have shown that forceful affinity of AgNPs to cell membrane may have a lytic effect.¹² Another possible explanation of AgNPs antimicrobial properties is a generation of reactive oxygen species (ROS), which also destroys cellular membrane.¹³ Moreover, Morones et al. have reported that 16nm AgNPs may inhibit enzymatic properties of proteins.¹² The impaired transport system of cells, due to AgNPs exposition, causes anion accumulation and blockage of the metabolic processes.¹² Furthermore, AgNPs are able to interfere with nucleic acids and enzymes, which makes those molecules biologically inactive.¹⁴ Dos Santos et al. reported that DNA damage makes bacterial cell unable to divide.³ In addition, AgNPs, in low concentration (below 2 μ M), have no effect on the viability of macrophages.¹⁰ Moreover, the presence of AgNPs triggers macrophages to phagocytosis what causes the reduction of bacterial survival, that effect is not present in an environment with AgNO₃.¹⁰ AgNPs have a stronger antibacterial effect than AgNO₃.¹⁰

Biofilm is a complex structure typically formed by several bacterial strains, in which crude specialization of the cells is observed. Because of structure, biofilm creates therapeutic intractability due to poor penetration of immune system's cells and antibiotics.⁹ Biofilm is major matter in intensive care, orthopedics and surgery.^{10,15} Treatment failure due to bacterial infection often lead to an unfavorable outcome for a patient and generates excessive costs. In the US, in 2009, the annual cost of infected prosthesis revision procedures was \$566 million and will probably increase to 1.62\$ billions in 2020 (almost 45% increase).¹⁵ The biofilm may occur on every surface which creates bacterial cells ability to adhere (e.g. catheters, implants etc.).⁹ AgNPs have the ability to penetrate through bacterial biofilm and exert a cytotoxic effect in concentration dependent manner. It is proven on biofilm of several bacterial strains such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Streptococcus mutants*.^{1,10} Cells of *Enterococcus faecalis* after AgNP treatment had a significantly disorganized biofilm, the number of

vital bacteria after treatment was also decreased.¹⁶ Moreover, it is reported that biofilm is less likely to form on catheter coated with AgNPs.³

Apart from antibacterial effect, another clinically important property of AgNPs is its antifungal effect. Fungal infections are typical for immunocompromised people such as patients infected with HIV, those who has cancer or transplanted organ.^{4,14} Intensive care units' patients and newborns are also in high-risk group.⁴ Selvaraj et al. have studied antifungal properties of polyvinylpyrrolidone stabilized quantum size silver, nanoparticles (PVP-AgNPs) on *Candida albicans*. *Candida albicans* is dimorphic commensal of humans' mucosa membranes, vaginal and oral cavities and is one of the causes of urinary tract infections.^{3,4} PVP-AgNPs inhibits the growth of *Candida albicans* in concentration dependent manner.⁴ Minimum inhibitory concentration (MIC) of PVP-AgNPs was determined at 70ng/mL, whereas for the amphotericin B this value was equal 0,5µg/mL and for ketoconazole, it was 8 µg/mL.⁴ Amphotericin B and ketoconazole are commonly used antifungal drugs.⁴ Transmission electron microscopic studies have shown shrinkage and deformation of *Candida albicans* cells.⁴ Additionally, disorganization of the cell membrane and cell wall was observed and granulation was found in cytoplasm and vacuoles.⁴ Pereira et al. assessed the antifungal activity of biosynthesized AgNPs (Bio-AgNPs). *Penicillium chrysogenum* and *Aspergillus oryzae* were used to the synthesis of Bio-AgNPs.¹⁴ Bio-AgNPs were cytotoxic to clinical and model strains of *Trichophyton rubrum*, which typically causes skin infection.¹⁴ Another member of trichosporum genus *Trichosporum asahii* is also susceptible to AgNPs.¹⁷ AgNPs inhibits the growth of this fungus in concentration dependent manner.¹⁷ AgNPs causes several ultrastructural changes in *Trichosporum asahii*.¹⁷ Aside of cellular membranes damage, condensation of chromatin, depolymerisation of ribosomes, density depletion of matrix and fragmentation of mitochondria were observed.¹⁷ The probable mechanism of AgNPs antifungal action is similar to its antibacterial activity (disruption of ATP production and DNA replication, generation of ROS, destruction of cell membranes integrity).^{14,6} Taken together AgNPs may be a prospective antifungal agent.

Viral disease due to uncomplicated transmission and in most cases lack of treatment are emerging medical problem. Orłowski et al. have proven that tannin modified AgNPs have antiviral properties against Herpes Simplex Virus – 2 (HSV-2) which causes sexually transmitted diseases, typically in the anogenital area.¹⁸

¹² J. R. Morones, J. L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J. B. Kouri, J. T. Ram, M. J. Yacaman, *Nanotech*, 2005, 2346, 2346–2353.

¹³ J. S. Kim, E. Kuk, K. N. Yu, J. H. Kim, S. J. Park, H. J. Lee, S. H. Kim, Y. K. Park, Y. H. Park, C. Y. Hwang, et al., *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, 2007, 3, 95–101.

¹⁴ L. Pereira, N. Dias, J. Carvalho, S. Fernandes, C. Santos, N. Lima, *J. Appl. Microbiol.*, 2014, 117, 1601–1613.

¹⁵ S. M. Kurtz, E. Lau, H. Watson, J. K. Schmier, J. Parvizi, *J. Arthroplasty*, 2012, 27, 61–5.e1.

¹⁶ D. Wu, W. Fan, A. Kishen, J. L. Gutmann, B. Fan, *J. Endod.*, 2014, 40, 285–290.

¹⁷ Z. K. Xia, Q. H. Ma, S. Y. Li, D. Q. Zhang, L. Cong, Y. L. Tian, R. Y. Yang, *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, 2016, 49, 182–188.

¹⁸ P. Orłowski, E. Tomaszewska, M. Gniadek, P. Baska, J. Nowakowska, J. Sokolowska, Z. Nowak, M. Donten, G. Celichowski, J. Grobelny, et al., *PLoS One*, 2014, 9, 1–15.

¹⁹ S. Gaikwad, A. Ingle, A. Gade, M. Rai, A. Falanga, N. Incoronato, L. Russo, S. Galdiero, M. Galdiero, *Int. J. Nanomedicine*, 2013, 8, 4303–4314.

Standard treatment against HSV-2 uses acyclovir as an antiviral drug, however growing resistance is becoming a clinical issue.¹⁹ AgNPs preclude attachment of HSV-2 to host cellular membrane, however, this effect was only accomplished in vitro studies.¹⁸ AgNPs exerts its antiviral effect only by direct contact with viruses.¹⁸ In vivo studies, have shown that AgNPs are not capable of preventing infection, but AgNPs can reduce infected area.¹⁸ Moreover, AgNPs up-regulate production of INF- γ , IL-10 and CCL2 cytokines.¹⁸ Gaikwad et al. also tested the influence of AgNPs on HSV-2, used Herpes Simplex Virus (HSV-1) and Human Parainfluenza Virus type 3 (HPIV-3) in experiments as well.¹⁹ AgNPs impair replication process of HSV-1 and HPIV-3 (decreased effectivity of replication up to 80%).¹⁹ The study has shown that AgNPs have no inhibitory effect on penetration of viruses through host's cell membrane.¹⁹ AgNPs act against several other viral strains such as Coxsackie virus B3, Hepatitis B virus and Vaccinia virus.³ Antiviral actions of AgNPs are explained by high affinity of AgNPs to glycoprotein and envelope of viruses.³

Apart from AgNPs, another noble metal nanoparticles with clinically useful attributes are gold nanoparticles. AuNPs, due to their unique properties, have a wide range of biomedical usage, too. Gold nanoparticles are the most common used nano-products in medical imaging.²⁰ AuNPs may be used as an agent for cells imaging.²¹ AuNPs may also be used in cancer diagnostic and thermoablation therapy or as a biosensors.^{22,23} Vaccines may be delivered by AuNPs due to their good penetration through cell membranes.² Such vaccines are thought to have less severe side effects than regular ones.² Zhou et al. have proven that immunization with AgNPs conjugated DNA vaccine is 10 times bigger than immunization with naked DNA vaccine.²⁴ Ahn et al. have proven that tumor's antigen presenting AuNPs vaccine may be used in neoplasm immunotherapy.²⁵ AuNPs have possible role in tuberculosis (TB) detection.²⁶ 8 million people are diagnosed and 1.4 die annually because of TB.²⁶ Spherical AuNPs may be used in the fast test to detect Mycobacterium tuberculosis complex which is the reason of TB infection.²⁶ The molecular aim of the test is 16s rDNA which is highly conservative among mycobacterium²⁶. The nano-gold test was positive for 45 genomic DNA samples.²⁶ The whole procedure takes an hour to be completed which is a great advantage.²⁶

Banu et al. assessed AuNPs properties in delivering the drug to breast cancer cells (MCF7 and MDA MB 231 cell lines).²⁷ Brest cancer is one of the most common

²⁰ U. Lee, C.-J. Yoo, Y.-J. Kim, Y.-M. Yoo, *J. Biosci. Bioeng.*, 2016, 121, 341–344.

²¹ R. Briñas, M. Hu, L. Qian, E. Lyman, J. Hainfeld, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130, 975–982.

²² R. M. Tripathi, A. Shrivastav, B. R. Shrivastav, *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.*, 2014, 1–7.

²³ L. Kafshdooz, T. Kafshdooz, Z. Razban, A. Akbarzadeh, *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.*, 2015, 1–6.

²⁴ X. Zhou, X. Zhang, X. Yu, X. Zha, Q. Fu, B. Liu, X. Wang, Y. Chen, Y. Chen, Y. Shan, et al., *Biomaterials*, 2008, 29, 111–117.

²⁵ S. Ahn, I. H. Lee, S. Kang, D. Kim, M. Choi, P. E. Saw, E. C. Shin, S. Jon, *Adv. Healthc. Mater.*, 2014, 3, 1194–1199.

²⁶ M. M. Hussain, T. M. Samir, H. M. E. Azzazy, *Clin. Biochem.*, 2013, 46, 633–637.

²⁷ H. Banu, D. K. Sethi, A. Edgar, A. Sherif, N. Rayees, N. Renuka, S. M. Faheem, K. Premkumar, G. Vasanthakumar, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, 2015, 149, 116–128.

²⁸ N. O. Mahmoodi, A. Ghavidast, N. Amirmahani, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, 2016, 162, 681–693.

female neoplasm.²⁷ Standard treatment protocol suggests chemotherapy (for example with doxorubicin), unfortunately, this type of remedy has severe side effects.²⁷ AuNPs surface was functionalized with thiolated folate polyethylene glycol then sodium-4-styrenesulfonate with doxorubicin was attached (FOL-AuNPs-DOX).²⁷ Folate was applied to increase uptake of FOL-AuNPs-DOX by cancer cells.²⁷ It is common that breast cancer cells have higher folate receptor expression than regular cells.^{27,28} FOL-AuNPs-DOX significantly decreases the viability of MCF7 and MDA MB 231 cells.²⁷ The more spectacular effect may be obtained when FOL-AuNPs-DOX treatment is combined with laser phototherapy.²⁷ FOL-AuNPs-DOX is thought to be anti-cancer effective treatment in a lower concentration than doxorubicin, so this may alleviate side effects of therapy.^{27,28} Further description of FOL-AuNPs-DOX cytotoxicity is placed in next section of the article. Brown et al. compared classical platinum compounds based chemotherapy with modified AuNP.²⁹ The AuNPs were functionalized with thiolated polyethylene glycol then the platinum chemical compound was attached (PEG-AuNPs-Pt).²⁹ Cytotoxicity was evaluated on epithelial lung cancer cells (A549 cell line) and colon cancer cells (HTC116, HCT15, HT29 and RKO cell lines).²⁹ Oxaliplatin is commonly used drug against those neoplasms.²⁹ In vitro cytotoxicity of PEG-AuNPs-Pt was 6 times greater than oxaliplatin.²⁹ Additionally, PEG-AuNPs-Pt have bigger cellular uptake than oxaliplatin.²⁹ For the A549 PEG-AuNPs-Pt were able to penetrate to nucleus.^{28,29}

3. Cytotoxic effect of silver and gold nanoparticles

Nanotoxicology is a new field of nanotechnology studies, which the main purpose is not containment of nanotechnology development but its support. The properly assessed risk of using NPs will create the possibility of reduction cytotoxic effects of NPs. Concurrent of nanotechnology and nanotoxicology will prevent the risk of medical application of NPs.

Cytotoxicity of AgNPs is especially important because 30% of all commercially available NPs products consist of silver nanoparticles.³⁰ AgNPs are widely used in medicine, they may be found in the prosthesis, implants, dental fillings, contraceptives devices, gloves, catheters, endotracheal tubes, surgical instruments, and dressings.³⁰ AgNPs may be released from implants and trigger cell death.^{30,31} Zielińska et al. have proven that AgNPs acts cytotoxicly on hFOB 1.19 osteoblast cell line.³¹ Cytotoxic properties of AgNPs depends on its size, shape, concentration, incubation time and functionalisation.³⁰ The larger NPs are the less severe their effects are.^{30,32} TEM analysis have shown that AgNPs can penetrate through the

²⁹ S. D. Brown, P. Nativo, J. A. Smith, D. Stirling, P. R. Edwards, B. Venugopal, D. J. Flint, J. A. Plumb, D. Graham, N. J. Wheate, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132, 4678–4684.

³⁰ J. Skalska, J. Strużyńska, *Folia Neuropathol.*, 2015, 53, 281–300.

³¹ E. Zielinska, C. Tukaj, M. W. Radomski, I. Inkielewicz-Stepniak, *PLoS One*, 2016, 11, e0164137.

³² W. H. De Jong, L. T. M. Van Der Ven, A. Sleijffers, M. V. D. Z. Park, E. H. J. M. Jansen, H. Van Loveren, R. J. Vandebruel, *Biomaterials*, 2013, 34, 8333–8343.

³³ P. V Asharani, M. P. Hande, S. Valiyaveetil, *BMC Cell Biol.*, 2009, 10, 65.

³⁴ I. Inkielewicz-Stepniak, M. J. Santos-Martinez, C. Medina, M. W. Radomski, *Int. J. Nanomedicine*, 2014, 9, 1677–1687.

biological membrane and the most probable mechanism of AgNPs penetration is endocytosis.³³ Due to that AgNPs were found in several cellular structures such as endosomes, lysosomes, and mitochondria.³³ Cells death of gingival cell lines: CRL-2014 and HGF-1 were observed after incubation with AgNPs.^{1,34} AgNPs penetrate into gingival cells and they are mainly found in mitochondria where NPs creates agglomerates.³⁴ AgNPs concentration in a dose-dependent manner sparks an upsurge of malondialdehyde (MDA) level.³⁴ MDA is a marker of lipid peroxidation.³⁴ The probable reason of increased level of MDA is exceeded generation of reactive oxygen species (ROS) because decreased total antioxidant capacity of gingival cells was observed.³⁴ AgNPs stimulate oxidative stress also in macrophages.³⁵ Other studies have shown that AgNPs up-regulate stress response genes.³³ Furthermore, Rahman et al. , during in vivo study, have proven that AgNPs have a neurotoxic effect which is explained by ROS generation.³⁶ Although ROS are generated physiologically during metabolic processes in mitochondria, a surplus of ROS production may affect cell viability.³⁶ AgNPs acts as a proinflammatory agent because they upregulate production of Tumor Necrosis Factor α , macrophage inhibitory protein, and IL-6.³⁵ Asharanii et al. have shown that AgNPs create fluctuation of calcium intracellular concentration.³³ Ca^{2+} is a cellular second messenger, change of its level may trigger cell response³³. In vivo research, have proven that intravenous administration of AgNPs is the cause of weight loss.³² Moreover, enlargement of spleen, liver and lymph nodes were observed.³² The microscopic analysis found AgNPs in several other localization: venous endothelial cells, inflammatory cells, kidneys, adrenal glands, intestinal tract, and lungs.³² Clinical chemistry analyses pointed out the increased level of liver enzymes (an indication of liver damage), decreased blood parameters which indicate cell generation (impaired blood cells production).³² Van der Zande et al. investigate in vivo toxicity of oral administration of AgNPs.³⁷ Administration of AgNPs per os is definitely less harmful than the injection of AgNPs.³⁷ Hepatotoxicity and immunotoxicity were not observed.³⁷

As for many other NPs cytotoxicity of AuNPs depends on dose, a way of administration, the chemistry of surface and physical dimension³⁸. Nowadays one of the most common ways of drug administration is a parenteral infusion, that is why knowing the impact of NPs on erythrocytes is extremely vital³⁹. Naked (non-coated) AuNPs after administration to the blood are being coated with plasma protein which may modify its cytotoxicity.³⁸ Aseichev et al. examined how AuNPs react with

³⁵ C. Carlson, S. M. Hussein, A. M. Schrand, L. K. Braydich-Stolle, K. L. Hess, R. L. Jones, J. J. Schlager, *J. Phys. Chem. B*, 2008, 112, 13608–13619.

³⁶ M. F. Rahman, J. Wang, T. A. Patterson, U. T. Saini, B. L. Robinson, G. D. Newport, R. C. Murdock, J. J. Schlager, S. M. Hussain, S. F. Ali, *Toxicol. Lett.*, 2009, 187, 15–21.

³⁷ M. Van Der Zande, R. J. Vandebriel, E. Van Doren, E. Kramer, Z. H. Rivera, C. S. Serrano-Rojero, E. R. Gremmer, J. Mast, R. J. B. Peters, P. C. H. Hollman, et al., *ACS Nano*, 2012, 6, 7427–7442.

³⁸ J. Chen, H. Wang, W. Long, X. Shen, D. Wu, S. S. Song, Y. M. Sun, P. X. Liu, S. Fan, F. Fan, et al., *Int. J. Nanomedicine*, 2013, 8, 2409–2419.

³⁹ A. V. Aseichev, O. A. Azizova, E. M. Beckman, O. I. Skotnikova, L. B. Dudnik, O. N. Shcheglovitova, V. I. Sergienko, *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2014, 156, 495–498.

⁴⁰ T. Mironava, M. Hadjiargyrou, M. Simon, M. H. Rafailovich, *Nanotoxicology*, 2014, 8, 189–201.

erythrocytes.³⁹ AuNPs causes hemolysis of red blood cells with hemoglobin release.³⁹ AuNPs acts cytotoxicity not only on erythrocytes but they inhibit proliferation of adipose tissue as well.⁴⁰ Influence of AuNPs on fat tissue is especially important for wound healing process.⁴⁰ AuNPs decrease ratio of adipose cells migration and collagen concentration which is crucial for wound healing.⁴⁰ Furthermore, the vacuoles were the only cellular organelle where AuNPs were accumulated.⁴⁰ AuNPs reduce lipid accumulation in adipocytes, up to 20-25%.⁴⁰ Additionally, AuNPs decreases adipogenesis, the amount of fibronectin in the intracellular matrix and adipokines secretion (by 65%).⁴⁰ Studies performed on epithelial-like lung cell culture (A549 cell line) have proven that AuNPs decrease glutathione (GSH) level due to ROS generation.⁴¹ Up-regulation of caspases 3-7 level was also observed, it may suggest that AuNPs stimulates apoptosis.⁴¹ Lee et al. examined the impact of AuNPs on human fetal neuronal precursor cells.²⁰ AuNPs reduces cell viability in a dose-dependent manner.²⁰ Banu et al. examined the effect of FOL-AuNPs-DOX on MCF7 and MDA MB 231 breast cancer cells.²⁷ Microscopical analyses conducted show that FOL-AuNPs-DOX treatment induces signs of apoptosis such as chromatin concentration, nuclear membrane degeneration and cells shrinkage.²⁷ Furthermore, up-regulation of p53 proapoptotic protein and down-regulation of Bcl-2 antiapoptotic protein was proven.²⁷ Chen et al. described the effect of peritoneal administration of polyethylene glycol-coated gold nanoparticles (PGE-AuNPs) in mice.³⁸ Statistically, important weight loss was observed.³⁸ Other symptoms of PGE-AuNPs administration were liver damage and inflammation.³⁸ Moreover, AuNPs impact on mice depends on their sex.³⁸ Male mice were more susceptible to the cytotoxic effect of PGE-AuNPs.³⁸ AuNPs can penetrate through the blood-brain barrier and they have a tendency to accumulate in the brain.⁴² Studies performed on Wistar rats have proven that AuNPs causes DNA damage in the cerebral cortex of animals.⁴² One of a possible explanation of wreckage of nucleic acid is a generation of free radicals.⁴²

4. Conclusions

AgNPs due to antibacterial, antiviral, antifungal and anti-biofilm actions may be prospective therapeutic agent.^{3,4,9,18} The underlying mechanism of major antimicrobial action includes ROS generation, DNA damage, and inhibition of proteins' enzymatic properties.¹²⁻¹⁴ Large surface area is one of the reasons why NPs exerts their effects because they give more sites to interaction with cellular receptors.¹⁴ However, we can not deny cytotoxicity of AgNPs on mammal cells, which is emerging as oxidative stress, lipid peroxidation, inflammation cell death.^{34,35} AuNPs may be used for cell imaging, diagnostic purposes, thermoablation or as a biosensors.^{21-23,26} However, there are more medical application of AuNPs.²

⁴¹ M. Sathishkumar, S. Pavagadhi, A. Mahadevan, R. Balasubramanian, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2015, 114, 232–40.

⁴² E. Cardoso, G. T. Rezin, E. T. Zanoni, F. de Souza Notoya, D. D. Leffa, A. P. Damiani, F. Daumann, J. C. O. Rodriguez, R. Benavides, L. da Silva, et al., *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 2014, 766–767, 25–30.

***CLINICAL APPLICATIONS OF SILVER AND GOLD NANOPARTICLES.
BENEFITS AND THREATS. A REVIEW.***

Especially interesting seem to be that functionalisation. AuNPs with chemotherapeutics attached may be more effective than the drug alone.²⁷⁻²⁹ However, AuNPs have a negative impact on erythrocytes and adipocytes.^{39,40} Wound healing effectivity is lower after administration of AuNPs.⁴⁰ Similarly to AgNPs, AuNPs generates ROS and promote inflammatory processes.^{34,35,38,41}

Both AgNPs and AuNPs have a variety of still growing biomedical applications. Nevertheless, administration of NPs to human body should always be a prelude by profit and loss accounts. As any other drug NPs are not free of side effects and cytotoxicity.

**ADIPOCERA I WONNE SUBSTANCJE LOTNE POWSTAJĄCE PODCZAS ROZKŁADU
LUDZKIEGO CIAŁA ORAZ ORGANIZMY ZDOLNE DO ICH WYKRYWANIA**

**ADIPOCERA AND FOUL SMELLING VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS PRODUCED
DURING HUMAN BODY DECOMPOSITION AND ORGANISMS CAPABLE
OF SENSING THEM**

Tomasz Swebocki

Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii
ul. Wita Stwosza 63, 80-308, Gdańsk
tomasz.swebocki@etoh.chem.univ.gda.pl

Streszczenie

Ludzki organizm stanowi niezwykle skomplikowany pod kątem biochemicznym układ. Jego komplikacja rośnie im bardziej wnikamy w jego strukturę zaś za jego złożoność odpowiada nie tylko rozmiar, ale również mnogość substancji chemicznych jakie go budują. Układ ten jest na wielu etapach samowystarczalny, jednak nie można pominąć faktu, że aby mógł się rozwijać, potrzebne są bardzo duże nakłady energii. Zarówno ilości związków chemicznych budujących nasz organizm jak i energia dostarczana tworzą „sieć” reakcji chemicznych, które nazywamy metabolizmem.

W momencie, gdy dochodzi do ustania funkcji życiowych i następuje zgon zachodzi szereg zjawisk metabolicznych dążących do całkowitego wyhamowania reakcji katabolicznych (rozkładu) i anabolicznych (syntezy). Wiele z tych zjawisk nie jest dostrzegalne dla obserwatora aż do rozpoczęcia procesów rozkładu. Jednym z pierwszych obserwowalnych etapów zgonu jest zatrzymanie akcji serca. W jej wyniku krew gromadzi się z najniższych partiach ciała tworząc plamy opadowe (łac. *livores mortis*). Następnie dochodzi do obniżenia pH wewnątrz włók w wyniku czego do organizmu wnikają bakterie gnilne. To z ich pomocą dochodzi do rozkładu ciała człowieka.

Niniejsza praca ma na celu przyjrzeć się dwóm grupom substancji jakie powstają podczas rozkładu ludzkich zwłok oraz różnym organizmom zdolnym do rozpoznawania lotnych substancji organicznych.

Abstract

A human body is a highly complex biochemical system. The more thoroughly we research its nature, the more complicated it becomes. Its complexity is due to its size as well as a multitude of substances it is made of. At many levels it is self-sufficient, but it should be borne in mind that in order for a human body to develop it is indispensable to provide it with a large amount of energy. Both the amount of chemical compounds and the energy the system uses result in a 'net' of chemical reactions defined as metabolism.

The moment an organism stops its living functions and a death occurs, a number of metabolic phenomena leading to an inhibition of catabolic and anabolic reactions take pace. Many such phenomena cannot be perceived by an observer until the time of a body's decomposition. Cardiac arrest is one of the first visible effects of death. As a consequence, blood sinks into the lowest parts of a body forming characteristic blood settlings known as

Adipocera i wonne substancje lotne powstające podczas rozkładu ludzkiego ciała oraz organizmy zdolne do ich wykrywania

livor mortis. As a result, pH of the organism decreases which allows for decomposing bacteria to penetrate it. Owing to these bacteria a human body starts to decompose.

This paper aims at characterizing two groups of substances which are produced during a human corpse's decomposition as well as a variety of organisms capable of sensing volatile organic compounds.

1. Wstęp

Zanim dojdzie do rozkładu ludzkiego ciała wyróżnić można cztery etapy: błądźć pośmiertną (łac. *pallor mortis*), oziębienie pośmiertne (łac. *algor mortis*), stężenie pośmiertne (łac. *rigor mortis*) oraz wystąpienie plam pośmiertnych (łac. *livores mortis*). Jednak rozkład ludzkiego ciała to nie tylko obserwowalne zjawiska. To również szereg reakcji, w wyniku których następuje właściwe gnicie organizmu z udziałem bakterii oraz innych drobnoustrojów. Już po kilku minutach od śmierci dochodzi do wstępnych reakcji rozkładu – jest to spowodowane autolizą struktur komórkowych w wyniku zmniejszającego się obiegu tlenu oraz rosnącego stężenia dwutlenku węgla. Następnie, w wyniku wniknięcia mikroorganizmów do zwłok następują dalsze procesy rozkładu tkanek i organów – efektem czego jest powstanie dużej ilości gazów (np.: CO₂, CO, (CH₃)₂S), co powoduje „puchnięcie” czy nabrzmienie ciała. Zwiększenie ciśnienia wewnątrz układu skutkuje zajściem kolejnych zmian chemicznych i fizycznych. Następnie do organizmu wnikają insekty – te składają jaja, z których po krótkim czasie wylęgają się larwy. Efektem bytowania larw w ludzkich zwłokach są dalsze procesy gnilne. Na tym etapie, ilość wonnych związków organicznych jest bardzo duża. Należy zaznaczyć, że zanim dojdzie do właściwego rozkładu ciała człowieka następuje szereg zmian właściwości układu takich jak: spadek (lub wyrównanie) temperatury z otoczeniem, wyczerpanie pokładów adenozy-5'-trifosforanu (ATP) czy zmiana pH ustroju. Zmiany te nie zachodzą od razu, ale stopniowo na przestrzeni od kilku do nawet kilkunastu (i więcej) godzin. Oznacza to, że na poszczególnych etapach rozkładu dochodzi do różnych reakcji rozkładu i biosyntezy. Mnogość tych reakcji skutkuje powstaniem bardzo dużej ilości produktów, spośród których rozpatrzę bardziej szczegółowo dwie grupy: adipocera oraz tzw. „trupie jady” (organiczne substancje odpowiedzialne za charakterystyczny, nieprzyjemny zapach rozkładającego się ludzkiego ciała), które należą do grupy lotnych związków organicznych - VOC (ang. *volatile organic compounds*).

2. Adipocera

Opisane w 1658 r. przez Thomasa Browne'a¹ adipocera to mieszaniny tłuszczowo-woskowe powstające podczas saponifikacji (zmydlania), czyli przeobrażania mas tłuszczowych w naszym organizmie. Są one złożone głównie z uwodornionych kwasów tłuszczowych domieszkowanych mydlami (w dużej mierze

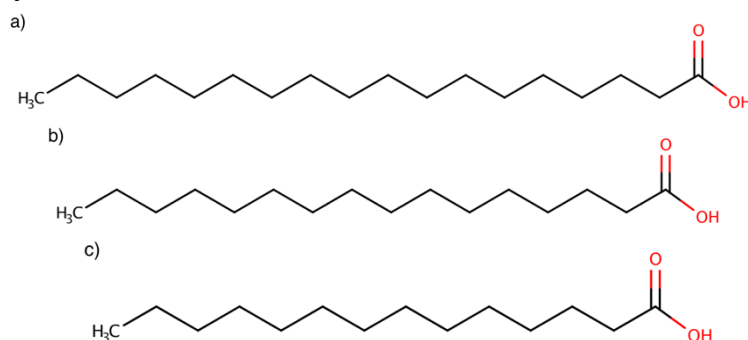
¹ A. Embar-Seddon, A. D. Pass, *Forensic Science*, Salem Press, 2008, 11.

Adipocera i wonne substancje lotne powstające podczas rozkładu ludzkiego ciała oraz organizmy zdolne do ich wykrywania

magnezowymi i wapniowymi).² Przyjmują szarą, szarobrunatną lub szarżółtą barwę. Do powstania adipocer może dojść w każdym miejscu w jakim występowały uprzednio tłuszcze, reakcje te wymagają jednak warunków wilgotnych bez dostępu tlenu. Za ich powstawanie odpowiadają bakterie anaerobowe (enzymy bakteryjne) oraz endogenne lipazy.^{3,4}

Tłuszcze ulegające saponifikacji to głównie tłuszcze zapasowe oraz triglicerydy. Zostają one przekształcone w nasycone kwasy tłuszczowe takie jak: kwas palmitynowy ($C_{16}H_{32}O_2$), kwas stearynowy ($C_{18}H_{36}O_2$) czy kwas mirystynowy ($C_{14}H_{28}O_2$). Na ich duże stężenia w miejscach pochówku wpływają dwie istotne cechy – bardzo niska lotność (prężność par np. kwasu stearynowego w warunkach standardowych jest niemierzalna, a w temp. $153^{\circ}C$ osiąga wartość zaledwie 10 Pa) oraz śladowa rozpuszczalność w wodzie (np. kwas stearynowy = 0,003 g/l). Jednak najważniejszym czynnikiem wpływającym na proces saponifikacji jest środowisko.^{5,6,7} Najbardziej sprzyjającymi warunkami są wilgoć oraz ograniczony dostęp tlenu, dlatego najczęściej adipocera można znaleźć w ciałach pochowanych w mokrej glebie, pod wodą czy na bagnach. Na ich powstanie nie wpływa to, czy ciało zostało wcześniej zabalsamowane, czy też nie.

Reakcje w wyniku których powstają adipocera zaczynają się dopiero kilka miesięcy po zgonie (o ile warunki są odpowiednie) a proces przeobrażania tłuszczów może trwać przez lata. Powstanie adipocer konserwuje ciało, co skutkuje zachowaniem niektórych struktur w stanie niezmienionym (w tym również różne uszkodzenia tkanek).¹ Dzięki temu zjawisku lekarze sądowi mogą później wyróżnić o wiele więcej szczegółów na temat czasu i powodu zgonu. Przykładem takiej konserwacji zwłok są np.: mumia „Ötzi”⁸, „człowieka z Birenze”⁹ i „Mydlana dama” – należy jednak podkreślić, że obecność adipocer była tylko jednym z kilku czynników skutkujących dobrym zachowaniem zwłok.



Schemat 1. Wzory strukturalne kwasów: a) stearynowego, b) palmitynowego, c) mirystynowego.

² S. Raszeja, *Medycyna sądowa: podręcznik dla studentów*, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa, 1993, 57.

³ S.L. Forbes, B.B. Dent, B.H. Stuart, *Forensic Science Int.*, 2005, 154, 35-43.

⁴ S.L. Forbes, B.B. Dent, B.H. Stuart, *Forensic Science Int.*, 2005, 154, 24-34.

⁵ T. Takatori, N. Ishiguro, H. Tarao, H. Matsumiya, *Forensic Science Int.*, 1986, 32, 5-11.

⁶ T. Takatori, N. Ishiguro, H. Tarao, H. Matsumiya, *Forensic Science Int.*, 1986, 32, 277-281.

⁷ S.J. Notter, B.H. Stuart, R. Rowe, N. Langlois, *J. Forensic Science*, 2009, 54, 195-201.

⁸ M. Thali, B. Lux, S. Losch, F.W. Rosing, J. Hurlimann, P. Feer, *Forensic Science Int.*, 2011, 211, 34-40.

⁹ T.L. Bereuter, W. Mikenda, C. Reiter, *Chemistry – A European Journal*, 1997, 3, 1032-1038.

3. Wonne lotne związki organiczne

Podczas rozkładu ludzkiego ciała dochodzi do produkcji wielu związków organicznych. O ile wykrycie znacznej części z nich wymaga odpowiednich technik laboratoryjnych, tak część z nich ze względu na swoje cechy (zapach) można rozpoznać od razu. Należą do nich m.in. niektóre lotne związki organiczne o charakterystycznym, nieprzyjemnym zapachu przynależących do tzw. „trupich jądów” – ptoamin (amin powstających podczas rozkładu ludzkiego ciała). Zalicza się do nich takie związki, jak m.in.: putrescyna, kadaweryna, metyloguanidyna czy neuryna. Równie charakterystycznym (wonnym) związkiem występującym jako produkt podczas procesów rozkładu jest skatol, metylopochozna indolu.

Aldehydy	Kwasy i estry	Inne	Alkohole
heks-2-enal	kwas propionowy	tetrachloroetylen	n-pentanol
heksanal	kwas masłowy	toluen	n-heksanol
aldehyd benzoesowy	kwas walerianowy	p-ksylen	okt-1-en-3-ol
hepta-2,4-dienal	maślan etylu	indol	2-etyloheksan-1-ol
hept-2-enal	kwas kapronowy	2-pentylofuran	n-oktanol
heptanal	maślan butylu	cykloheksanon	
okt-2-enal	kapran etylu	hepta-2-non	
oktanal	kapran pentylu	siarczek dimetylu	
nona-2,4-dienal	kapran heksylu		
nonanal			

Tabela 1. Zestawienie niektórych lotnych związków organicznych wydzielanych podczas rozkładu ludzkich zwłok.¹⁰

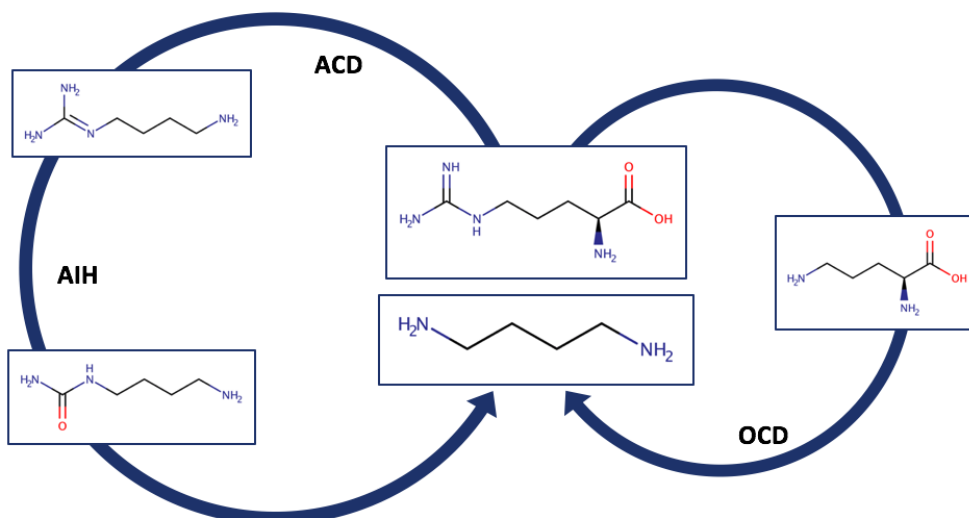
Putrescyna (butano-1,4-diamina) jest substancją powszechnie spotykaną w naszym organizmie. Jest ona obecna m.in.: w osoczu, moczu, nasieniu, krwi czy ślinie.¹¹ Do jej produkcji dochodzi w dwojaki sposób:

1. Pierwszy szlak zaczyna się od przekształcenia argininy w agmatynę poprzez działanie dekarboksylazy argininowej (ACD). Następnie agmatyna zostaje przekształcona w karbamilo-putrescynę poprzez działanie hydrolazy agmatyno-iminowej (AIH). Ostatnim etapem jest przekształcenie karbamilo-putrescyny w putrescynę.¹²
2. W drugim przypadku następuje dwuetapowa reakcja. Pierwszy etap to przekształcenie argininy w ornitynę. Następnie ornityna ulega dekarboksylacji wskutek działania dekarboksylazy ornitynowej (OCD).¹²

¹⁰ S. Fiedler, A. E. Berns, L. Schwark, A.T. Woelk. M. Graw, *Forensic Science Int.*, 2015, 257, 320-328.

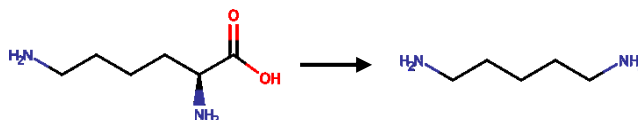
¹¹ Dostępne na stronie: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/273>; dostęp z dnia 14.05.2017.

Adipocera i wonne substancje lotne powstające podczas rozkładu ludzkiego ciała oraz organizmy zdolne do ich wykrywania



Schemat 2. Szlaki powstawania putrescyny.

Kadaweryna (pentano-1,5-diamina) to związek powstający w wyniku dekarboksylacji endogennego aminokwasu – lizyny poprzez działanie dekarboksylazy lizynowej.¹² Jest ona drugą obok putrescyny dobrze poznaną ptoaminą.



Schemat 3. Dekarboksylacja lizyny do kadaweryny.

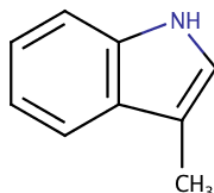
Zarówno kadaweryna jak i putrescyna są związkami o silnej woni, opisywanej jako zapach gnijącego mięsa. Na przestrzeni lat narosło dużo „miejskich legend” w związku z licznymi zatruciami tymi ptoaminami – należy jednak podchodzić do nich ze sceptycyzmem, z racji tego, że dawka LD₅₀ wynosi około 2g/kg.

Skatol (3-metylo-1H-indol) to kolejna substancja, której zapach kojarzony jest ze śmiercią. Za jej opisanie odpowiedzialny jest Ludwig Brieger (również on odkrył i opisał kadawerynę). Jako pochodna indolu, związek ten w małych dawkach charakteryzuje się dość przyjemnym zapachem (aromaty kwiatowe) jednak wraz z zwiększaniem stężenia zapach przechodzi w nieprzyjemną woń fekaliiów (w których skatol jest obecny). Skatol występuje też w niektórych kwiatach (np. jaśmin) przez co stał się jednym ze związków zapachowych dodawanych do perfum. Jest on również jednym z dodatków smakowych dodawanych do papierosów. W przemyśle występuje

¹² W. Legrum, *Riechstoffe, zwischen Gestank und Duft*, Vieweg + Teubner Verlag, Wiesbaden, 2011, 65.

Adipocera i wonne substancje lotne powstające podczas rozkładu ludzkiego ciała oraz organizmy zdolne do ich wykrywania

on najczęściej w postaci sykiego białego krystalicznego proszku, który z czasem brązowieje. Za jego zapach odpowiada najprawdopodobniej obecność grupy pirolowej. W organizmie powstaje wskutek przekształcenia tryptofanu w przewodzie pokarmowym.¹³ W porównaniu do kadaweryny i putrescyny jest bardziej toksyczny, LD₅₀ wynosi około 1g/kg.¹⁴



Schemat 4. Wzór strukturalny skatolu.

Stężenia wyżej wymienionych substancji w ludzkich zwłokach nie są stałe – zależą one od takich czynników, jak: wilgotność, temperatura otoczenia, pH ustroju, ułożenie ciała względem podłoża, dostęp do tlenu i światła czy też od ciśnienia panującego wewnątrz zwłok. Taka ilość czynników praktycznie uniemożliwia określenie czasu zgonu – dlatego prace nad metodą datowania zwłok z wykorzystaniem stężeń pośmiertnych tych substancji raczej nigdy nie będą prowadzone.

4. Zwierzęta zdolne do wykrywania lotnych substancji organicznych

Podczas wielu akcji policyjnych, takich jak poszukiwanie osób uprowadzonych, wykrywanie narkotyków lub poszukiwanie zwłok, służbom mundurowym towarzyszą wyspecjalizowane psy, tzw. jednostki K-9. Ich powszechne wykorzystywanie wiąże się przede wszystkim z bardzo dobrym węchem oraz podatnością na trening (warunkowanie) i posłuszeństwem.¹⁵ Najczęściej spotykanymi gatunkami psów służących w policji są owczarki niemieckie oraz owczarki belgijskie (Malinois). Jednostki te są specjalizowane na kilka grup. Do najważniejsze z punktu widzenia chemii należą psy zdolne do rozpoznawania profili zapachowych (narkotyki, zwłoki). Psy po zapoznaniu się z danym zapachem, podążają za śladowymi ilościami substancji, które są za niego odpowiedzialne. Mimo, iż naukowcy pracują nad stworzeniem aparatury zdolnej do wykrywania odpowiednich związków lotnych, nie udało się jeszcze stworzyć na tyle dokładnych urządzeń, aby mogły zastąpić psi węch.¹⁵

Niestety skuteczność psów policyjnych jest dość ograniczona. Do ich treningów używa się różnych fragmentów ciała, które, aby mogły przetrwać przez dłuższy czas, są preparowane w specyficzny sposób. Za pomocą obecnie stosowanych metod konserwacji materiałów biologicznych trudno jest zatrzymać rozkład struktur komórkowych – można go jednak znacznie spowolnić. Zarówno sam rozkład jak i konserwacja powodują powstanie konkretnego profilu zapachów. Psy uczone na

¹³ Dostępne na stronie: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/skatole>; dostęp z dnia 14.05.2017.

¹⁴ D.L. Opdyke, *Food and Cosmetics Toxicology*, 1975, 13, 449-457.

¹⁵ O. Leitch, A. Anderson, K.P. Kirkbride, C. Lennard, *Forensic Science Int.*, 2013, 232, 92-103.

stałych profilach zapachów zostają ograniczone do rozpoznawania głównie tych wyuczonych. Dlatego zaleca się, aby trening opierał się na jak najbardziej zróżnicowanej ilości próbek – tak aby skojarzeń zapachowych było jak najwięcej.¹⁶ Do dzisiaj trwają prace nad scharakteryzowaniem konkretnych profili wonnych. Na dany profil może się składać jedna substancja albo cała grupa. Okazuje się bowiem, że w niektórych przypadkach psy wykrywały nie konkretne substancje, ale inne produkty, które powstały podczas produkcji pierwotnej substancji (np. w przypadkach narkotyków). Niektóre psy nie wykazały żadnej reakcji na oczyszczone substancje (np. w przypadku metamfetaminy). Psy powinny też być w nienagannym stanie zdrowotnym (jakakolwiek choroba czy defekt pola węchowego może wykluczyć psa).

Okazuje się, że nie tylko ssaki mają dobrze rozwinięty węch. Również wśród bezkręgowców można szukać gatunków zdolnych do rozpoznawania konkretnych zapachów związków chemicznych. *Microplitis croceipes* to gatunek owadów należący do rodziny męszelkowatych. Na drodze ewolucji wykształciły one bardzo dobry zmysł węchu, zdolny do rozpoznania bardzo dużej ilości substancji.¹⁷ Umiejętność ta służy im do rozpoznawania pokarmów oraz odpowiedniego gospodarza do złożenia jaj (*Microplitis croceipes* są parazytoidami). Zdolność do rozpoznawania konkretnych substancji u tego gatunku była przedmiotem wielu badań w warunkach laboratoryjnych. Okazało się, że owady te da się wyspecjalizować do rozpoznawania konkretnych substancji lotnych. I tak badania pokazały, że *M. croceipes* udało się nauczyć rozpoznawać takie substancje jak: 2,4-dinitrotoluen, 3,4-dinitrotoluen, cykloheksanon, benzoesan metylu, kadaweryna czy putrescyna.¹⁸ Reakcje na bodźce węchowe obejmowały: latanie wkoło danego punktu, pocieranie antenkami po powierzchni, wkładanie głowy do miejsc wylotu substancji lotnych oraz gromadzenie się kilku osobników w jednym miejscu celem znalezienia źródła zapachu. Nie można jednak założyć, że parazytoidy te są zdolne do rozróżniania wszystkich zapachów. Badania dowiodły, że *M. croceipes* były niezdolne do uwarunkowania na takie substancje jak nonanol czy dekanol.¹⁹ Wykazano również, że przedstawiciele tego gatunku byli w stanie rozróżnić stosunkowo podobne do siebie substancje różniące się tylko długością łańcucha lub miejscem podstawienia grupy funkcyjnej.¹⁹

5. Podsumowanie

Substancje wytwarzane podczas rozkładu ludzkiego ciała pozwalają powiązać czas i miejsce zdarzeń kryminalnych. Analiza ich składu chemicznego i stężenia stwarza duże pole do badań dla współczesnej chemii, medycyny sądowej oraz innych nauk pokrewnych kryminalistyce. Badania nad tą grupą związków dają szereg wskazówek do pracy techników kryminalistycznych i praktyki w postępowaniu kryminalistycznym. Dalszy rozwój badań nad drogami powstawania i rozkładu oraz

¹⁶ K.G. Furton, R. Harper, *Analysis and Interpretation of Fire Scene Evidence*, CRC Press, Boca Raton, 2004, 75-96.

¹⁷ C.M. de Moraes, *Nature*, 1993, 393, 570-573.

¹⁸ G.C. Rains, *Transactions of the ASAE*, 2004, 47, 2145-2152.

¹⁹ T. Meiners, F. Wäckers, W.J. Lewis, *Chemical Senses*, 2002, 27, 811-816.

Adipocera i wonne substancje lotne powstające podczas rozkładu ludzkiego ciała oraz organizmy zdolne do ich wykrywania

detekcją wonnych substancji lotnych powstających podczas rozkładu ciała ludzkiego potrzebny jest nie tylko z punktu widzenia poznawczego, ale ma również istotne znaczenie praktyczne.

Należy zwrócić również uwagę na problem związany ze skutecznością „biologicznych sensorów” a metodą ich warunkowania. Często podczas szkolenia stosuje się te same próbki, a jak już zostało wspomniane wcześniej, profile wonne dla psów policyjnych powinny być jak najbardziej zróżnicowane. Dalsze badania pozwolą na stworzenie lepszych syntetycznych profili wonnych – to umożliwi bardziej efektywne szkolenie, co finalnie przełoży się bezpośrednio na skuteczność wykrywania substancji chemicznych przez psy policyjne.

Indeks osób

Fajkis Nikola	7
Galek Mariusz	7
Grajek Henryk	24
Inkielewicz-Stępnia Iwona	48
Kawczyński Marcin	16
Kostrzewa Tomasz	16
Kostrzewa-Irtych Anna	16
Kuban-Jankowska Alicja	16
Jonik Justyna	24
Purchała Marcin	24
Skarbek Małgorzata	36
Steckiewicz Karol	48
Swebrocki Tomasz	57
Wawer Tomasz	24
Woźniak Michał	16, 48
Zielińska Ewelina	48



ZARZĄD SEKCJI STUDENCKIEJ Polskiego Towarzystwa Chemicznego



inż. Hanna Makowska
Przewodnicząca SSPTChem
Politechnika Łódzka
Wydział Chemiczny



inż. Pola Cybulska
Członek Zarządu
Politechnika Wrocławska
Wydział Chemiczny



mgr inż. Paulina Filipczak
Członek Zarządu
Politechnika Łódzka
Wydział Chemiczny



Gabriela Handzlik
Członek Zarządu
Uniwersytet Jagielloński
Wydział Chemii



mgr Marek Kłobucki
Członek Zarządu
Uniwersytet Przyrodniczy
Wydział Nauk o Żywności



Tomasz Kostrzewa
Członek Zarządu
Uniwersytet Gdański
Wydział Chemii



Przemysław Piątek
Członek Zarządu
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
Wydział Chemii



mgr Justyna Piechocka
Członek Zarządu
Uniwersytet Łódzki
Wydział Chemii



mgr Piotr Stasiewicz
Członek Zarządu
Uniwersytet w Białymstoku
Wydział Biologiczno-Chemiczny



Dr hab. Jacek Lipok, prof. UO
Opiekun SSPTChem
Uniwersytet Opolski
Wydział Chemii



mgr inż. Anna Stefaniuk-Grams
Doradca SSPTChem
Politechnika Łódzka
Wydział Chemiczny

CHEMIA

cztery etapy do sukcesu
na maturze

etap 1.

ZBIÓR ZADAŃ



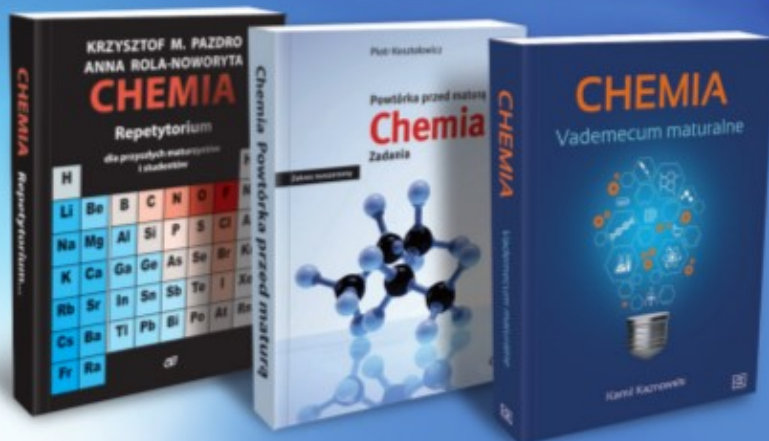
etap 2.

ZADANIA PRZEDMATURALNE



etap 3.

POWTÓRKA PRZED MATURĄ



etap 4.

PRÓBNE ARKUSZE



ISBN 978-83-7594-156-2



www.pazdro.com.pl

25 lat
wydawnictwa



OFICyna
EDUKACYJNA
KRZYSZTOF PAZDRO