

INTERDYSCYPLINARNE BADANIA W NAUKACH PRZYRODNICZYCH

INNOWACJE, ANALIZY I PERSPEKTYWY

Redakcja: Kinga Kalbarczyk, Alicja Danielewska



Lublin 2023

**Interdyscyplinarne badania
w naukach przyrodniczych –
innowacje, analizy i perspektywy**

Interdyscyplinarne badania w naukach przyrodniczych – innowacje, analizy i perspektywy

Redakcja:
Kinga Kalbarczyk
Alicja Danielewska

Lublin 2023

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

Recenzentami niniejszej monografii byli:

- prof. dr hab. n. farm. Anna Malm
- prof. dr hab. inż. Jadwiga Wierzbowska
- dr hab. inż. Grzegorz Chladek
- dr hab. Małgorzata Dmitryjuk, prof. UWM
- dr hab. Barbara Łata
- dr hab. inż. Beata Mossety-Leszczak
- dr hab. Aneta Ptaszyńska
- dr hab. Karolina Szewczyk-Golec, prof. UMK
- dr Urszula Czyżewska
- dr n. o zdr. Mariola Janiszewska
- dr inż. Alicja Kot-Niewiadomska
- dr inż. Agnieszka Szczotok

Wszystkie opublikowane rozdziały otrzymały pozytywne recenzje.

Skład i łamanie:
Monika Maciąg

Projekt okładki:
Marcin Szklarczyk

Korekta:
Małgorzata Gabrys

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

ISBN 978-83-67104-89-0

Wydawca:
Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o.
ul. Głowackiego 35/341, 20-060 Lublin
www.wydawnictwo-tygiel.pl

Spis treści

Bartosz Sułkowski

Charakterystyka wybranych stopów na osnowie Zn i Mg do zastosowań medycznych....7

Agnieszka Kołodziejczak-Radzimska, Monika Strugała, Teofil Jesionowski

Enzymy proteolityczne – charakterystyka, zastosowanie oraz immobilizacja20

Anna Konieczna-Molenda

Zastosowanie glukozylotransferazy cyklodekstrynowej (CGTazy) immobilizowanej na nośniku polimerowym do produkcji cyklodekstryn35

Aleksandra Orzoł, Małgorzata Szultka-Młyńska, Katarzyna Głowacka Aneta
Krakowska-Sieprawska, Michał Złoch, Bogusław Buszewski

Zmiany w zawartości glutationu i aktywności reduktazy glutationowej u grochu (*Pisum sativum* L.) w odpowiedzi na suplementację krzemem podczas stresu kadmowego45

Justyna Miłek

Metoda wyznaczania energii aktywacji i dezaktywacji bioprocessów z zastosowaniem immobilizowanych enzymów.....61

Maria Trętowicz, Remigiusz Bąchor

Analiza profili białkowych u pacjentów poddanych terapii cyklosporyną A z zastosowaniem spektrometrii mas72

Waldemar Studziński, Daria Bożejwicz, Katarzyna Witt

Wpływ metali ciężkich na środowisko i człowieka.....85

Patryk Drejka, Marta Chrószcz-Porębska, Izabela Barszczewska-Rybarek

Czwartorzędowe amoniowe pochodne monomeru uretanowo-dimetakrylanowego i ich polimery.....97

Iwona Jonczy, Krzysztof Filipowicz

Charakterystyka mineralogiczno-chemiczna żużli hutniczych po przeróbce rud Zn-Pb ze zwałowisk w Wirku i Bykowinie (Ruda Śląska).....108

Dorota Dardas, Zuzanna Nowacka

Wyodrębnianie i stabilizacja jednorodnego obszaru w układach ciekłokrystalicznych za pomocą kontrolowanego fotowysbielenia laserowego120

Aleksandra Wichrowska, Izabela Wąsowicz, Karolina Dylewska, Maja Kirzyc, Wiktoria Wasylko, Joanna Banasiewicz

Dezynfekcja i jej oddziaływanie na bakterie ze szczególnym uwzględnieniem form przetrwalnych133

Liliana Woszczak, Karen Khachatryan	
Opracowywanie alternatywnej metody identyfikacji miodów	147
Joanna Kmiecik, Irena Baranowska-Bosiacka, Agnieszka Kolasa	
Immunohistochemiczna ocena ekspresji wybranych enzymów antyoksydacyjnych w najądrzu szczurów szczepu Wistar otrzymujących ołów i cynk.....	158
Indeks Autorów.....	174

Charakterystyka wybranych stopów na osnowie Zn i Mg do zastosowań medycznych

1. Wprowadzenie

Współczesna nauka i medycyna udostępniają wiele możliwości niepełnosprawnym ludziom, aby umożliwić im powrót do normalnego życia. Bardzo często różnego rodzaju protezy, takie jak endoprotezy stawu biodrowego, stenty czy śruby do łączenia kości – wykonane z odpowiedniego materiału – stanowią dla tych ludzi jedyną szansę do samodzielnego funkcjonowania.

Stan zdrowia, wiek pacjenta i dobór odpowiedniego materiału są to niezwykle ważne czynniki mające wpływ na funkcjonowanie protezy medycznej. Nowoczesną grupę materiałów na protezy medyczne stanowią biodegradowalne stopy metali. Stopy te cechują się unikatowymi właściwościami do stopniowego rozpuszczania się w ciele pacjenta bez skutków ubocznych. Proteza wykonana z biodegradowalnego stopu metali nie musi być później usuwana z ciała pacjenta.

W niniejszej pracy przedstawiono wybrane biodegradowalne stopy na osnowie Zn i Mg (w dalszej części tekstu opisywane jako stopy Zn i Mg). Celem pracy jest przybliżenie czytelnikowi tematyki biodegradowalnych stopów na osnowie Zn i Mg oraz przedstawienie problemów, z jakimi należy się mierzyć podczas projektowania stopów na protezy medyczne. W pracy omówiono wpływ dodatków stopowych oraz rodzaj przeróbki plastycznej i tekstury na właściwości wybranych stopów na osnowie Zn i Mg. Dyskusji poddano również możliwości poprawy tych właściwości oraz przedstawiono potencjalnie najlepsze stopy do zastosowań medycznych. Praca ma charakter przeglądowy i stanowi podsumowanie wcześniejszych prac oraz wyników badań.

2. Biodegradowalne stopy metali

Materiały biodegradowalne to materiały, które po spełnieniu swojej funkcji rozkładają się do prostych związków bez skutków ubocznych dla pacjenta [1-5]. Takimi materiałami są niektóre polimery, metale i ich stopy. Obecnie stosowane biodegradowalne polimery, takie jak na przykład polilaktyd (PLA), mają najlepszą biokompatybilność, ponieważ zawierają nieszkodliwe pierwiastki, takie jak tlen, wodór i węgiel. Jednak ich właściwości mechaniczne są niewystarczające i nie nadają się do użytku protetycznego [1-4]. W związku z tym istnieje bardzo duże zainteresowanie metalami jako materiałami bazowymi w stopach biodegradowalnych. Metale takie jak Zn i Mg charakteryzują się doskonałą biotolerancją, a ich stopy, dzięki odpowiednio dobranym dodatkom stopowym, dobrymi właściwościami mechanicznymi [1, 3].

Materiał z przeznaczeniem na protezy medyczne powinien charakteryzować się granicą plastyczności powyżej 200 MPa, a granica wytrzymałości na rozciąganie musi

¹ bartosz.sulkowski@agh.edu.pl, Wydział Metali Nieżelaznych, Katedra Nauki o Materiałach i Inżynierii Metali Nieżelaznych, Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie, al. Adama Mickiewicza 30, 30-059 Kraków.

wynosić powyżej 300 MPa. Bardzo istotna jest również odpowiednia wytrzymałość zmęczenia, która powinna wynosić 150 MPa przy liczbie cykli na poziomie 20^6 . Kluczowa jest szybkość korozji, która ma być na poziomie 0,02 mm/rok. Parametry, jakimi powinien cechować się biodegradowalny materiał metaliczny, zostały zebrane w tabeli 1 [1-9].

Tabela 1. Wymagane właściwości dla stopów biomedycznych

$R_{0,2}$ [MPa]	R_m [MPa]	A [%]	Szybkość korozji [mm/rok]	Wytrzymałość na zmęczenie (20^6 cykli)	E [GPa]
min. 200	min. 300	15-18	max. 0,02	150 MPa	40-60

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [1-10].

Właściwości materiałów biodegradowalnych muszą być starannie dobrane, aby ograniczyć do minimum skutki uboczne ich obecności w organizmie. Takimi skutkami mogą być na przykład alergię, stany zapalne czy efekt ekranowania naprężeń [7-10]. Ostatnie z wymienionych niepożądanych zdarzeń polega na utracie masy kostnej wokół protezy w wyniku przenoszenia naprężeń przez protezę, jeżeli wartość modułu Younga protezy jest znacznie większa od wartości modułu Younga kości. Inne negatywne efekty mogą być wynikiem procesów aktywowanych na powierzchni protezy i tworzenia się tkanek.

Metale ulegające biodegradacji to nowe materiały, które są opracowywane w celu zastąpienia powszechnie stosowanych materiałów na protezy. Obecnie protezy wykonuje się z odpowiednich gatunków stali nierdzewnej lub stopów na osnowie tytanu, ponieważ są to materiały bardzo wytrzymałe, spełniające wymogi biogodności i odporne na korozję [1, 2, 6, 7]. Niestety protezy wykonane z tych materiałów muszą zostać usunięte po procesie rekonwalescencji i niezbędna jest wtedy operacja medyczna, czasami ryzykowna dla zdrowia pacjenta. W celu uniknięcia operacji medycznej opracowywane są biodegradowalne stopy metali, które rozpuszczają się w organizmie człowieka po spełnieniu swojej funkcji. Wiele badań naukowych wskazuje, że stopy na osnowie Zn i Mg stanowią nowoczesną grupę materiałów stosowanych jako stopy biodegradowalne [1-9]. Biodegradowalny materiał powinien stopniowo korodować w organizmie człowieka, nie wytwarzając żadnych toksycznych ani uczulających związków, a naturalne procesy biologiczne powinny z łatwością usuwać produkty korozji z organizmu człowieka [8, 9].

Wiele metali wykazuje dobrą biokompatybilność, na przykład Ti, Nb, Zr, ale najlepszymi kandydatami są stopy na osnowie cynku i magnezu ze względu na ich najlepszą biokompatybilność i ważne funkcje, jakie w organizmie człowieka spełnia Zn i Mg. W tabeli 2 porównano kilka metali pod względem ich biokompatybilności.

Tabela 2. Zestawienie różnych metali pod względem możliwości stosowania na biodegradowalne protezy

Szkodliwe metale	Niezalecane	Tolerowane	Metale biogodne
Co, Cu, Ni, V	Fe, Al, Mo, Au, Ag	Pt, Ta, , Ti, Zr	Zn, Mg

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [1-9].

Magnez jest składnikiem organizmu człowieka niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania wielu narządów. Na przykład wspiera funkcje neurologiczne i trawienne, pomaga w tworzeniu wielu enzymów i ma pozytywny wpływ na serce. Jego dzienne zapotrzebowanie wynosi około 400 mg, a przedawkowanie zdarza się niezwykle rzadko, ponieważ organizm człowieka z łatwością radzi sobie z dużą zawartością Mg [8, 9].

Cynk jest również mikroelementem bardzo ważnym dla prawidłowego funkcjonowania wielu narządów i układów narządów człowieka. Do jego funkcji należy wspomaganie układu odpornościowego oraz wytwarzanie wielu enzymów i białek. Jednak jego dzienne zalecane spożycie wynosi około 40 mg. Niestety dane na temat skutków dłuższego przedawkowywania Zn w organizmie człowieka są ograniczone [8, 9].

Biodegradowalne stopy na osnowie Zn i Mg charakteryzują się wieloma zaletami: brak przewlekłych stanów zapalnych, brak uciążliwych i ryzykownych operacji usuwania implantów, dobre właściwości mechaniczne, łatwiejsza produkcja i obróbka [1, 2].

Proces rozkładu materiału biodegradowalnego w ciele pacjenta musi być dokładnie kontrolowany. Właściwości korozyjne biodegradowalnych stopów metali są bardzo wrażliwe na wiele czynników. Tymi czynnikami są: skład chemiczny, środowisko, wielkość ziarna, tekstura, obróbka cieplna i procesy produkcyjne [1-10]. Kluczowym elementem dobrej jakości protezy jest zrównoważenie odpowiednich właściwości mechanicznych, szybkości korozji, kosztów produkcji i biokompatybilności. Dwa najważniejsze parametry wpływające na właściwości materiałów to ich skład chemiczny i struktura.

Pierwiastki Zn i Mg są metalami niskotopliwymi o słabych właściwościach mechanicznych [6]. Co więcej, te dwa metale krystalizują w strukturze heksagonalnej o gęstym ułożeniu atomów (HCP, ang. *Hexagonal Close Packed*) i wykazują bardzo silną anizotropię właściwości [6]. Zn i Mg nie tworzą z wieloma metalami roztworów stałych, zwłaszcza z metalami nietoksycznymi, takimi jak Ti, Nb lub Zr. Prowadzi to do wydzielania się faz międzymetalicznych już przy niewielkiej zawartości dodatku stopowego. Wysoka zawartość innych metali w stopach Zn i Mg przyczynia się do powstawania układów wielofazowych, które pogarszają właściwości korozyjne. Wielofazowy materiał metaliczny ze względu na pojawienie się korozji galwanicznej jest bardzo wrażliwy na agresywne środowisko korozyjne, takie jak ludzkie ciało, co prowadzi do bardzo szybkiego rozpuszczenia się materiału.

3. Mechanizmy korozji

Korozja występuje, gdy na powierzchni próbki zachodzą procesy chemiczne rozpuszczania metalu w wyniku kontaktu z roztworem – bez rozróżnienia między obszarami anodowymi i katodowymi [11-19]. Najlepszym sposobem wizualizacji korozji jest sporządzenie izodiagramów przedstawiających zależność między składem chemicznym roztworu a jego właściwościami elektrochemicznymi. Izodiagramy ilustrują szybkość korozji w jednostkach (mm/rok) w określonej cieczy przy różnych stężeniach i temperaturach. Jednak ogólny mechanizm nie jest przedstawiony na takich schematach.

Istnieje wiele różnych mechanizmów korozji [11]. Przykładowo – korozja galwaniczna ma miejsce, gdy dwa metale o różnych potencjałach są połączone elektrycznie i zanurzone w elektrolicie. Następnie tworzą ogniwo galwaniczne, w którym metal o wyższym potencjale jest katodowy, natomiast metal o niższym potencjale jest anodowany i rozpuszcza się. Metale Zn i Mg mają bardzo niski potencjał chemiczny, przez co są narażone na korozję anodową. Innym mechanizmem korozji jest korozja wżerowa. W tym

mechanizmie odporny metal (na przykład aluminium lub stal nierdzewna) jest pokryty cienką warstwą tlenku. Jednak gdy warstwa ochronna zostanie mechanicznie uszkodzona, w niektórych miejscach rozpoczyna się korozja odsłoniętych części.

Bardzo podobny mechanizm zachodzi w trakcie korozji szczelinowej. W tym mechanizmie płyn korozyjny pozostaje przez dłuższy czas w małych szczelinach, w których obieg płynu jest ograniczony. Korozja może rozpocząć się w określonym miejscu wskutek sprzyjających warunków, takich jak spadek wartości pH. Szybkość korozji stopów Zn i Mg jest bardzo wrażliwa na małe wartości pH [11].

W korozji międzykrystalicznej proces degradacji zachodzi między granicami ziaren wewnątrz metalu [11-19]. W tym mechanizmie korozja jest wrażliwa na całkowitą powierzchnię graniczną ziaren i czas zanurzenia metalu w cieczy korozyjnej. Bardzo niebezpiecznym mechanizmem jest korozja naprężeniowa, która w szczególności oddziałuje na metale w dynamicznych warunkach naprężeń. W przypadku korozji naprężeniowej mikropęknięcia powstają w wyniku zmęczenia materiału. Te mikropęknięcia są sprzyjającymi miejscami dla korozji. Protezy medyczne na osnowie Zn i Mg mogą być bardzo poważnie narażone na tego rodzaju korozję ze względu na charakter ich zastosowania [11-19].

Innym mechanizmem korozji, o którym należy wspomnieć, jest korozja erozyjna. Korozja występuje w tym mechanizmie w wyniku dużej szybkości przepływu płynu erodującego materiał metaliczny i tworzącego wżery. Jest to ważne, ponieważ w organizmie człowieka wszystkie płyny ustrojowe działają na protezę, powodując jej erozję. Wszystkie te mechanizmy korozji mogą zachodzić w organizmie pacjenta w wyniku kontaktu protezy z tkankami i płynami ustrojowymi. Jednak ważne jest zbadanie wpływu właściwości stopu biodegradowalnego na konkretny proces korozji. Możliwe, że struktura, tekstura i skład chemiczny znacząco wpływają na niektóre mechanizmy, podczas gdy na inne nie mają prawie żadnego wpływu. Należy to zbadać bardziej szczegółowo za pomocą eksperymentów i modelowania komputerowego [11-19].

W biodegradowalnych stopach Zn i Mg korozja galwaniczna może wystąpić, gdy – przykładowo – śruba ze stopu Zn zostanie połączona z płytkami kostnymi wykonanymi z tytanu lub stali nierdzewnej [11, 13]. Co ważniejsze, korozja mikrogalwaniczna może zaistnieć między osnową α -Zn a jej drugą fazą, czyli związkami międzymetalicznymi. Korozja galwaniczna stopów cynku silnie zależy od pH roztworu. Stopy Zn mają pewną odporność na korozję, gdy pH jest bardzo wysokie – ze względu na warstwę ochronną $\text{Zn}(\text{OH})_2$. Z drugiej strony w roztworach chlorków lub przy niskim pH korozja stopów Zn jest bardzo intensywna [11]. Korozja wżerowa rozpoczyna się między α -Zn a wydzieleniami w stopach Zn z drugimi fazami lub związkami międzymetalicznymi; jest bardzo wrażliwa na wielkość oraz morfologię ziaren [20, 21]. Dlatego szczególnie ważna jest jednolita struktura. Jednakże w strukturze drobnoziarnistej druga faza jest rozproszona wzdłuż granicy ziaren, stanowiąc miejsce aktywacyjne dla procesu korozji [11]. Dodatek w stopach niewielkich ilości innego pierwiastka, takiego jak na przykład magnez czy srebro, jest pod tym względem korzystny, ponieważ prowadzi do zwiększenia dyspersji wydzieleni oraz ich lokalizacji wewnątrz ziaren [15, 16].

W metalach o strukturze krystalicznej ściennie centrowanej (FCC, ang. *face centered cubic*) i przestrzennie centrowanej (BCC, ang. *body centered cubic*) najwyższe szybkości korozji odnotowano odpowiednio dla orientacji $\{111\}$ i $\{100\}$. Te orientacje charakteryzują się najgęstszym ułożeniem atomów w metalach takich jak Cu lub Al. W Zn i Mg,

które są metalami heksagonalnymi, zauważono, że szybkość korozji jest najmniejsza w płaszczyźnie podstawy słupa heksagonalnego i rośnie wraz ze zmniejszaniem się gęstości atomowej płaszczyzny. Dla płaszczyzn pryzmatycznych $\{10\bar{1}0\}$ i $\{11\bar{2}0\}$ szybkości korozji są wyższe niż dla płaszczyzny podstawy słupa heksagonalnego [15, 16]. Jednak niektórzy badacze zauważyli, że szybkość korozji określonej płaszczyzny krystalograficznej jest również bardzo silnie związana z grubością warstwy tlenku w najgęściej upakowanych kierunkach [15, 16]. Wykazano również, że tylko korozja anodowa jest podatna na orientację krystalograficzną, podczas gdy korozja katodowa jest odporna na orientację krystalograficzną [16]. Ale stopy zachowują się na różne sposoby. Na przykład dodatek Al zwiększa grubość tlenkowej warstwy ochronnej, która jest silnie zależna od orientacji krystalograficznej. Z kolei dodatek Cu zmniejsza ogólne właściwości korozyjne Zn, jak również zależność zachowania korozyjnego od orientacji krystalograficznej [16].

4. Dodatki stopowe oraz ich wpływ na właściwości stopów Zn i Mg

Aluminium jest pierwiastkiem stopowym, podnoszącym właściwości mechaniczne Zn i Mg [6, 21]. Stąd powszechnie stosowane są stopy Zn-Al i Mg-Al [6, 22, 23]. Inne pierwiastki, takie jak Mn, Ag i Zr, mają znaczący wpływ na wzrost właściwości mechanicznych, wzrost szybkości korozji i odporności na pęcznienie stopów Zn i Mg. Jednak te pierwiastki chemiczne zwiększają również koszt stopu [23]. Większość wymienionych wyżej pierwiastków, na przykład Al czy Mn, nie jest pożądana w materiałach biodegradowalnych ze względu na ich niską biogodność i szkodliwy wpływ na organizm człowieka [9, 10]. Stąd wiele stopów biodegradowalnych opartych jest na cynku i magnezie, a nawet srebrze [9].

Cynk tworzy roztwory stałe w układach dwuskładnikowych z Mg i Ag, gdy zawartość dodatku stopowego nie przekracza 1% wag. Podobna sytuacja występuje w stopach na osnowie Mg. Taka niska zawartość dodatku stopowego nie zwiększa w wystarczającym stopniu właściwości mechanicznych tych materiałów [6], lecz wyższe stężenie dodatków stopowych znacznie zwiększa szybkość korozji stopów biodegradowalnych na osnowie Zn i Mg. Okazuje się również, że niektóre pierwiastki, takie jak Y i metale ziem rzadkich (*Rare Earth Elements*, RE), bardzo korzystnie wpływają na rozdrobnienie ziarna, poprawę właściwości wytrzymałościowych oraz, co bardzo istotne, na odporność korozyjną [8, 10, 11].

Głównymi dodatkami do stopów na osnowie cynku są: Al, Mg, Mn, Zr, Ag, Li, V [1, 8, 11]. Tradycyjnym dodatkiem stopowym do cynku jest Al. Cynk i aluminium tworzą wtedy stop (tzw. *znal*), który nie nadaje się do zastosowań medycznych. Pierwiastki takie jak Mg i Ag to główne dodatki w biodegradowalnych stopach na osnowie Zn. Srebro nieznacznie poprawia właściwości mechaniczne stopów Zn w zakresie występowania roztworu stałego, ale za to bardzo wpływa na poprawę plastyczności. Magnez znacząco poprawia właściwości mechaniczne stopów Zn, ponieważ nawet przy niewielkiej ilości dodatku Mg tworzą się fazy międzymetaliczne. Magnez i srebro to powszechnie stosowane pierwiastki chemiczne dodawane do stopów Zn w celu poprawy właściwości mechanicznych i plastycznych [6, 9, 23]. Jednak niewielka rozpuszczalność tych dwóch metali stanowi poważne ograniczenie w ich stosowaniu. Inne pierwiastki, takie jak Cu czy V, poprawiają właściwości mechaniczne i antykorozyjne [9]. Jednak wanadu należy unikać w stopach biodegradowalnych ze względu na szkodliwy wpływ tego pierwiastka. W tabeli 3 zestawiono główne dodatki stopowe i ich wpływ na strukturę i właściwości biodegradowalnych stopów na osnowie Zn.

Tabela 3. Zestawienie wpływu różnych dodatków stopowych na właściwości stopów Zn

	Al	Mg	Cu	Ag	Li	V
Rozdrobnienie ziarna	duży		duży			duży
Wytrzymałość na rozciąganie	duży	duży	duży		duży	duży
Wytrzymałość w podwyższonej temperaturze	–	–	–	–	–	duży
Plastyczność		negatywny	–	bardzo duży	duży	–
Odporność na korozję	duży	negatywny	duży	duży	negatywny	duży

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [1, 6, 8, 9, 11, 23].

W stopach na osnowie Mg głównym dodatkiem są pierwiastki Al i Zn [3-5, 7, 8, 10]. Powstają wtedy stopy magnezu oznaczane jako AZ. Aluminium i cynk poprawiają właściwości mechaniczne, ale Zn, szczególnie przy dużych zawartościach Al pogarsza plastyczność stopów Mg. Mn i Zr są dodawane w celu poprawy właściwości mechanicznych, a Zr również w celu rozdrobnienia struktury. Al, Mn, Y i metale ziem rzadkich pozytywnie wpływają na odporność korozyjną stopów Mg, a pierwiastki takie jak Ag, Li, Ca pogarszają właściwości korozyjne. W stopach magnezu z dodatkiem Zr i Ag obserwuje się utrzymanie dobrych właściwości mechanicznych w podwyższonej temperaturze. W tabeli 4 zestawiono wpływ różnych dodatków stopowych na właściwości stopów Mg.

Tabela 4. Zestawienie wpływu różnych dodatków stopowych na właściwości stopów Mg

	Al	Zn	Mn	Zr	Ag	Ca	Y	Re
Rozdrobnienie ziarna	duży	–	–	bardzo duży	–	duży	duży	–
Wytrzymałość na rozciąganie	duży	duży	duży	duży	duży	duży	duży	duży
Wytrzymałość w podwyższonej temperaturze	–	–	–	duży	duży	–	–	–
Plastyczność	duży	negatywny	duży	duży	–	–	–	–
Odporność na korozję	duży	–	duży	–	negatywny	negatywny	duży	duży

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [3-10].

5. Właściwości wybranych stopów biodegradowalnych na osnowie Zn i Mg

Biodegradowalne stopy na osnowie Zn to przeważnie stopy dwuskładnikowe o niewielkiej zawartości dodatku stopowego [1, 6, 8, 9, 23]. Czysty cynk jest metalem nieplastycznym o niekorzystnych właściwościach mechanicznych. Granica plastyczności wynosi ok. 15-20 MPa, a granica wytrzymałości osiąga wartość 50 MPa. Szybkość korozji czystego Zn wynosi od 0,33 mm/rok do 0,78 mm/rok. Dodatek stopowy Mg podwyższa właściwości dwuskładnikowych stopów Zn-Mg, granica plastyczności wzrasta do wartości 191 MPa, a granica wytrzymałości do wartości 237 MPa przy zawartości Mg wynoszącej 1,5% wag. Stopy te posiadają jednak bardzo małą plastyczność, nieprzekraczającą wartości 1,5%. Szybkość korozji jest na poziomie od 0,27 mm/rok do 0,3 mm/rok. Pierwiastki takie jak Ca i Sr poprawiają właściwości mechaniczne stopów Zn, granica plastyczności jest na poziomie od 189 Mpa do 206 MPa, a granica wytrzymałości na rozciąganie na poziomie od 220 Mpa do 253 MPa [9, 23]. Bardzo dobre są za to właściwości plastyczne, wydłużenie osiąga wartość bliską nawet 20%. Szybkość korozji kształtuje się w przedziale od 0,89 mm/rok do 0,96 mm/rok [9, 23]. Poprzez dodatek stopowy Mn w ilości 0,1% w stopie Zn-1Mg-0,1Mn można podnieść granicę wytrzymałości na rozciąganie do poziomu prawie 300 MPa przy zachowaniu bardzo dobrych właściwości plastycznych, gdzie wydłużenie osiąga wartość 26% [9, 23]. Stop ten posiada wystarczające właściwości antykorozyjne, szybkość korozji jest na poziomie 0,11 mm/rok [1, 6, 8, 9, 23].

W przypadku biodegradowalnych stopów na osnowie Mg – tu również dominują stopy dwuskładnikowe, gdzie głównymi dodatkami stopowymi są Zn, Mn, Ca, Sr [1, 3, 7, 8, 10, 24]. Można wskazać takie stopy jak Mg-1Ca, Mg-2Sr, Mg-6Zn, które charakteryzują się granicą plastyczności na poziomie od 136 Mpa do 170 MPa i granicą wytrzymałości na poziomie od 240 MPa do 280 MPa. Stop o najlepszych właściwościach plastycznych z tej grupy to stop Mg-6Zn [1, 3]. Największą szybkością korozji, wynoszącą 2,18 mm/rok, charakteryzuje się stop Mg-1Ca, natomiast dla stopu Zn-6Mg szybkość korozji wynosi 0,07 mm/rok [1, 3]. Trójskładnikowy stop Mg taki jak Mg-1Zn-1Mn posiada granicę plastyczności wynoszącą 247 MPa i granicę wytrzymałości na rozciąganie na poziomie 280 MPa, a szybkość korozji wynosi 2,52 mm/rok. Inny trójskładnikowy stop – Mg-3Sn-0,5Mn – posiada gorsze właściwości wytrzymałościowe ($R_{0,2} = 150$ MPa i $R_m = 240$ MPa), ale za to jest bardzo plastyczny i cechuje się szybkością korozji na poziomie 0,34 mm/rok [1, 3, 10]. Zestawienie wybranych stopów biodegradowalnych na osnowie Zn i Mg oraz ich właściwości mechaniczne zaprezentowano w tabeli 5.

Tabela 5. Zestawienie właściwości różnych stopów biodegradowalnych na osnowie Zn i Mg

Stop	Metoda otrzymywania	$R_{0,2}$ [MPa]	R_m [MPa]	Wydłużenie A [%]	Szybkość korozji [mm/rok]
Zn	odlewanie	15	20	0,3	0,033
Zn	walcowanie	30	50	5,7	0,078
Zn-1Mg	odlewanie	110	155	1,5	0,027
Zn-1,5Mg	odlewanie	190	235	0,4	0,030
Zn-1Ca	walcowanie	205	255	12,8	0,089
Zn-1Sr	walcowanie	190	230	19,7	0,096

Zn-1Mg-0,1Mn	walcowanie na gorąco	195	230	26,1	0,11
Mg-1Ca	wyciskanie	135	240	10,6	2,18
Mg-2Sr	walcowanie	145	215	3,2	0,37
Mg-6Zn	wyciskanie	170	280	18,8	0,07
Mg-1Zn-1Mn	wyciskanie	245	280	21,8	2,52
Mg-3Sn-0,5Mn	wyciskanie	150	240	23	0,34

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [1-24].

6. Wpływ przeróbki plastycznej na właściwości stopów Zn i Mg

Ze względu na potrzebę stosowania małej zawartości dodatków stopowych (często poniżej 1% wag.) stopy Zn i Mg mają niedostateczne właściwości mechaniczne do zastosowań medycznych. W celu zwiększenia właściwości mechanicznych stopów Zn i Mg można zastosować metody przeróbki plastycznej, zwłaszcza metody dużego odkształcenia plastycznego (SPD, ang. *severe plastic deformation*) [25]. Przetwarzanie metali metodami SPD jest prowadzone w temperaturze otoczenia, dzięki czemu ogranicza się procesy zdrowienia i rekrytalizacji metali. Przeróbka SPD prowadzi do rozdrobnienia ziarna nawet do rozmiarów nanometrycznych, dzięki czemu poprawione są właściwości mechaniczne odkształconych materiałów.

Tradycyjne metody, takie jak walcowanie na zimno i gorąco, wyciskanie czy kucie, są mniej efektywne niż niektóre metody dużego odkształcenia plastycznego (SPD) [23, 25-27]. Jednak przetwarzanie SPD zwiększa anizotropię właściwości w metalach heksagonalnych. Silna anizotropia właściwości jest efektem ewolucji tekstur podczas przeróbki SPD [25, 28]. Intensywne tekstury w metalach mają negatywny wpływ na właściwości mechaniczne i korozyjne, ponieważ właściwości te są bardzo wrażliwe na kierunki krystalograficzne metali [23, 29, 30]. Zrównoważenie właściwości mechanicznych i antykorozyjnych ma kluczowe znaczenie dla zaprojektowania dobrej jakości, trwałych protez. Istnieje zatem potrzeba kontrolowania ewolucji tekstury podczas wytwarzania materiału na protezę. W trakcie walcowania powstaje tekstura typu bazalnego (0001), gdzie oś *c* komórki heksagonalnej większości ziaren układa się wzdłuż kierunku normalnego (KN) arkusza blachy. Dodatki stopowe powodują rozszczepienie głównego piku tekstury na dwa komponenty odchylone od KN w stronę kierunku walcowania (KW) [23, 29, 30].

Podczas wyciskania powstaje tekstura typu $\langle 10\bar{1}0 \rangle$ fiber, gdzie w większości ziaren oś *c* komórki heksagonalnej jest ustawiona prostopadle do kierunku wyciskania (ED, ang. *extrusion direction*) [22, 28, 29, 31, 32]. Wyciskanie w podwyższonych temperaturach prowadzi do powstania tekstury typu $\langle 11\bar{2}0 \rangle$ fiber na skutek procesów dynamicznej rekrytalizacji. Podczas przetwarzania materiału metodami SPD takimi jak wyciskanie kątowe (ECAP, ang. *equal channel angular pressing*) lub skręcanie pod wysokim ciśnieniem (HPT, ang. *high pressure torsion*) powstaje tekstura typu B-fiber, gdzie oś *c* komórki heksagonalnej większości ziaren ustawiona jest prostopadle do KN i kierunku poprzecznego (KP), może być również odchylona od swojej idealnej pozycji na skutek procesów rekrytalizacji [25, 28, 29, 31, 32]. W tabeli 6 przedstawiono podstawowe typy tekstury powstałe w wyniku przeróbki plastycznej w metalach o sieci krystalicznej heksagonalnej.

Tabela 6. Podstawowe typy tekstury w metalach o sieci krystalicznej heksagonalnej oraz ich wpływ na szybkość korozji

Rodzaj przeróbki plastycznej	Typ tekstury	Figura biegunowa	Wpływ na szybkość korozji	
Walcowanie niestopowych Zn i Mg	(0001) basal		(0001) 	bardzo duży
Walcowanie stopów Zn i Mg	(0001) basal (dwa piki)		(0001) 	duży
Wyciskanie Wyciskanie w podwyższonych temperaturach	$\{10\bar{1}0\}$ fiber $\langle 11\bar{2}0 \rangle$ fiber		(0001) 	umiarkowany
ECAP HPT	B-fiber		(0001) 	duży

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [22, 28, 29, 31, 32].

Rodzaj przeróbki plastycznej bardzo istotnie wpływa na właściwości mechaniczne. Prowadzi do rozdrobnienia struktury, ale również do formowania się odpowiedniego typu tekstury [17]. Wykazano, że wzrost temperatury zmniejsza szybkość korozji, ale tylko w stopach o niższym stężeniu pierwiastków stopowych. Jednak wielkość ziaren materiału odgrywa ważną rolę w kształtowaniu właściwości korozyjnych stopów Zn [29]. W roztworach, w których materiał pokrywa się warstwą pasywną, granice ziaren zwiększają właściwości antykorozyjne poprzez zwiększenie pasywowanej warstwy podłoża. Gdy natomiast materiał nie pokrywa się warstwą pasywacyjną, granice ziaren działają odwrotnie, znacznie pogarszając właściwości antykorozyjne ze względu na większą ogólną objętość nieciągłości między ziarnami [8]. Jak wykazały badania, szyb-

kość korozji teksturowanych stopów Zn i Mg jest najniższa dla materiałów o najsilniejszych teksturach bazowych, podczas gdy komponenty przyrmatyczne $\langle 10\bar{1}0 \rangle$ *fiber* lub $\langle 11\bar{2}0 \rangle$ *fiber* wykazują największą szybkość korozji [18, 19, 33]. Wyniki te pokrywają się z szybkościami korozji w monokryształach, gdzie płaszczyzna (0001) charakteryzuje się najniższą szybkością korozji [16]. Silne tekstury w zdeformowanych stopach Zn i Mg mają jeden główny składnik i kilka drugorzędnych, co niezwykle komplikuje identyfikację mechanizmu korozji [23]. Na przykład po walcowaniu występuje silna tekstura bazalna, gdzie kierunek $[0001] \parallel \text{KN}$, podczas gdy w trakcie wyciskania występuje tekstura promieniowa z ułożeniem kierunków $\langle 10\bar{1}0 \rangle \parallel \text{ED}$ i $\{11\bar{2}0\} \parallel \text{ED}$ [24]. Przeróbka plastyczna w podwyższonych temperaturach lub wyżarzanie materiału prowadzą do formowania się złożonej tekstury posiadającej wiele intensywnych komponentów [17, 23, 24, 29, 30].

Pomimo faktu, że biodegradowalne stopy Zn i Mg są nowymi materiałami, które zyskały wiele uwagi ze względu na swoją doskonałą biokompatybilność, istnieje niewiele badań poświęconych wpływowi tekstury na ich właściwości. Większość wyników dostępnych w literaturze dotyczy wyłącznie właściwości mechanicznych, z bardzo małą korelacją tekstury i właściwości korozyjnych.

7. Podsumowanie

Dobór odpowiednich stopów biodegradowalnych na osnowie Zn lub Mg do zastosowań medycznych jest bardzo trudny, ponieważ należy wziąć pod uwagę bardzo wiele czynników. Tymi czynnikami są skład chemiczny, właściwości mechaniczne i korozyjne, struktura oraz tekstura. Proteza medyczna, spełniając swoją funkcję, nie powinna narażać zdrowia pacjenta.

Na podstawie przeprowadzonego przeglądu literatury można stwierdzić, że potencjalnie odpowiednim stopem na osnowie Zn jest trójskładnikowy stop Zn-1Mg-0,1Mn walcowany na gorąco. Jego właściwości mechaniczne i korozyjne są najbardziej zbliżone do wymagań, jakie są stawiane stopom metali przeznaczonym na protezy medyczne. Aktualnie wielkość wytrzymałości na rozciąganie jest niewystarczająca oraz zbyt duża jest szybkość korozji. Powodem tego może być niewielka zawartość dodatków stopowych, szczególnie Mn. Poprawę właściwości mechanicznych można osiągnąć poprzez zastosowanie dodatkowo jednej z metod dużego odkształcenia plastycznego, na przykład HPT. Spowoduje to rozdrobnienie struktury i zwiększenie wytrzymałości. Poprawę właściwości antykorozyjnych można osiągnąć poprzez redukcję dodatków stopowych oraz zwiększenie dyspersji faz międzymetalicznych. W tym wypadku również obiecująca może się okazać dodatkowa operacja przetwarzania stopu metodami SPD.

W przypadku stopów na osnowie Mg przeznaczonych na protezy biodegradowalne należy rozpatrywać stop Mg-6Zn po wyciskaniu. Jego właściwości mechaniczne i korozyjne są bardzo bliskie wymaganiom przedstawionym w tabeli 1. Podobnie jak w przypadku stopu Zn-1Mg-0,1Mn, również i w tym wypadku potrzebna jest poprawa właściwości poprzez odpowiedni rodzaj przeróbki plastycznej z zastosowaniem metod SPD. Należy zwrócić uwagę na fakt, że pomimo dużej zawartości Zn w tym stopie i tworzeniu się faz międzymetalicznych, szybkość korozji jest na niewielkim poziomie. Być może zastosowanie metody HPT pozwoli znacząco zwiększyć wytrzymałość na rozciąganie i zredukować zawartość Zn, tym samym jeszcze bardziej zmniejszając szybkość korozji tego materiału.

Najbardziej odpowiednim rodzajem przeróbki plastycznej, jaki można by zastosować w celu rozdrobnienia struktury i poprawy przez to właściwości mechanicznych biodegradowalnych stopów na osnowie Zn i Mg, jest wyciskanie w podwyższonych temperaturach i później zastosowanie metod dużego odkształcenia plastycznego. Otrzymuje się wtedy materiał o teksturze typu $\langle 11\bar{2}0 \rangle$ fiber lub $\langle 10\bar{1}0 \rangle$ fiber, a ten rodzaj tekstury ma umiarkowany wpływ na właściwości korozyjne biodegradowalnych stopów Zn i Mg. Należy jednak przeprowadzić odpowiednie badania w celu ustalenia mechanizmów wpływających na szybkość korozji tych materiałów. Znajomość mechanizmów korozji pozwoli lepiej kontrolować skład chemiczny oraz metody przetwarzania biodegradowalnych stopów na osnowie Zn i Mg.

Literatura

1. Smallman R.E., Bishop R.J., *Biomaterials*, [w:] *Modern physical metallurgy and materials engineering* (sixth edition), Butterworth-Heinemann, 1999, s. 394-405, <https://doi.org/10.1016/B978-075064564-5/50013-6>.
2. Ridzwan M.I.Z., Shuib S., Hassan A.Y., Shokri A.A., Mohamad Ibrahim M.N., *Problem of stress shielding and improvement to the hip implant designs. A review*, Journal of Medical Sciences, 7, 2007, s. 460-467, [dx.doi.org/10.3923/jms.2007.460.467](https://doi.org/10.3923/jms.2007.460.467).
3. Zhang S., Zhanga X., Zhao C., Li J., Song Y., Xie C., Tao H., Zhang Y., He Y., Jiang Y., Bian Y., *Research on an Mg-Zn alloy as a degradable biomaterial*, Acta Biomaterialia, 6, 2010, s. 626-640, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.06.028>.
4. Sułkowski B., *Biodegradowalne stopy na bazie Zn*, Stal, Metale & Nowe Technologie, nr 11-12, 2020, s. 68-71.
5. Sułkowski B., *Biodegradowalne stopy na bazie Mg*, Stal, Metale & Nowe Technologie, nr 5-6, 2020, s. 32-37.
6. Kainer K.U. (red.), *Magnesium alloys and their applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2020, doi: 10.1002/3527607552.
7. Franz K.J., Metzler-Nolte N., *Introduction. Metals in medicine*, Chem. Rev., 119, 2019, s. 727-729, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00685>.
8. Prasad K., Bazaka O., Chua M., Rochford M., Fedrick L., Spoor J., Symes R., Tieppo M., Collins C., Cao A., Markwell D., Ostrikov K., Bazaka K., *Metallic biomaterials. Current challenges and opportunities*, Materials, 10, 2017, s. 884-917, doi:10.3390/ma10080884.
9. Venezuela J., Dargusch M.S., *The influence of alloying and fabrication techniques on the mechanical properties, biodegradability and biocompatibility of zinc. A comprehensive review*, Acta Biomaterialia, 87, 2019, s. 1-40.
10. Saini M., Singh Y., Arora P., Arora V., Jain K., *Implant biomaterials. A comprehensive review*, World J Clin Cases, 3, 2015, s. 52-57, doi: 10.12998/wjcc.v3.i1.52.
11. Pola A., Tocci M., Goodwin F.E., *Review of microstructures and properties of zinc alloys*, Metals 10, 2020, s. 253, doi:10.3390/met10020253.
12. Vojtěch D., Kubásek J., Šerák J., Novák P., *Mechanical and corrosion properties of newly developed biodegradable Zn-based alloys for bone fixation*, Acta Biomaterialia, 7(9), 2011, s. 3515-3522.
13. Gu Z.W., Han Y., Pan F.S., Wang X., Weng D., Zhou S., *Effect of microstructure and texture on corrosion resistance of magnesium alloy*, Materials Science Forum, 610-613, 2009, s. 1160-1163, doi: 10.4028/www.scientific.net/MSF.610-613.1160.
14. Choudhury P., Das S., *Effect of microstructure on the corrosion behavior of a zinc-aluminium alloy*, Journal of Materials Science, 40, 2005, s. 805-807.

15. Bland L.G., Gusieva K., Scully J.R., *Effect of crystallographic orientation on the corrosion of magnesium. Comparison of film forming and bare crystal facets using electrochemical impedance and raman spectroscopy*, *Electrochimica Acta*, 227, 2017, s. 136-151, <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2016.12.107>.
16. Prosek T., Nazarov A., Bexell U., Thierry D., Serak J., *Corrosion mechanism of model zinc-magnesium alloys in atmospheric conditions*, *Corrosion Science*, 50(8), 2008, s. 2216-2231.
17. Raeissi K., Golozar M.A., Saatchi A., Szpunar J.A., *The effect of texture on the corrosion resistance of zinc electrodeposits*, *The International Journal of Surface Engineering and Coatings*, 83, 2005, s. 99-103.
18. Bahmani A., Arthanari S., Shin K.S., *Formulation of corrosion rate of magnesium alloys using microstructural parameters*, *Journal of Magnesium and Alloys*, 8, 2020, s. 134-149.
19. Zhang X.G., *Corrosion materials – corrosion of zinc and zinc alloys*, ASM International, 13B, 2005.
20. Beaussant T.K., Ashraf K.F., Örnberg A., Weissenrieder J., *Zn-Mg and Zn-Ag degradation mechanism under biologically relevant conditions*, *Surface Innovations* 1-2, 2018, s. 81-92.
21. Ojdanic A., Horky J., Mingler B., Fanetti M., Gardonio S., Valant M., Sulkowski B., Schafner E., Orlov D., Zehetbauer M.J., *The effects of severe plastic deformation and/or thermal treatment on the mechanical properties of biodegradable Mg-alloys*, *Metals*, 10, 2020, s. 1064, <https://doi.org/10.3390/met10081064>.
22. Guleryuz L.F., Ipek R., Arıman I., Karaoglu S., *Microstructure and mechanical properties of zn-mg alloys as implant materials manufactured by powder metallurgy method*, *AIP Conference Proceedings*, 2017, s. 1809, <https://doi.org/10.1063/1.4975435>.
23. Yue R., Zhang J., Ke G., Ji G., Huang H., Pei J., Kang B., Zeng H., Yuan G., *Effects of extrusion temperature on microstructure, mechanical properties and in vitro degradation behavior of biodegradable Zn-3Cu-0.5Fe alloy*, *Materials Science and Engineering*, 105, 2019, s. 110106.
24. Liu X., Sun J., Zhou F., Yang Y., Chang R., Qiu K., Pu Z., Li L., Zheng Y., *Micro-alloying with Mn in Zn-Mg alloy for future biodegradable metals application*, *Materials and Design*, 94, 2016, s. 95-104.
25. Zehetbauer M.J., Valiev R.Z., *Nanomaterials by severe plastic deformation*, *Archives of Materials Science*, 26, s. 235-261, doi: 10.1002/3527602461.
26. Panigrahi A., Sulkowski B., Ozaltın K., Pukens A., Lewandowska M., Skrotzki W., Chrominski W., Horky J., Zehetbauer M.J., *Mechanical properties, structural and texture evolution of biocompatible Ti-45Nb alloy processed by severe plastic deformation*, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 62, 2016, s. 93-105, <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2016.04.042>.
27. Sulkowski B., Panigrahi A., Ozaltın K., Lewandowska M., Mikułowski B., Zehetbauer M.J., *Evolution of strength and structure during SPD processing of Ti-45Nb alloys. Experiments and simulations*, *Journal of Materials Science* 49, 2014, s. 6648-6655, <https://doi.org/10.1007/s10853-014-8320-2>.
28. Bonarski B.J., Schafner E., Mingler B., Skrotzki W., Mikułowski B., Zehetbauer M.J., *Texture evolution of Mg during high-pressure torsion*, *Journal of Materials Science*, 43, 2008, s. 7513-7518.
29. Sulkowski B., *The effect of structure and texture on pure magnesium properties*, *Int. J. Mater. Res.*, 112, 2021, s. 1, <https://doi.org/10.1515/ijmr-2020-7815>.
30. Pospíšilová I., Vojtěch D., *Zinc alloys for biodegradable medical implants*, *Materials Science Forum*, 782, 2014, s. 457-460.
31. Wang Y.N., Huang J.C., *Texture analysis in hexagonal materials*, *Materials Chemistry and Physics*, 81, 2003, s. 11-26.

32. Gehrman R., Frommert M.M., Gottstein G., *Texture effects on plastic deformation of magnesium*, Materials Science and Engineering A, 395, 2005, s. 338-349, doi: 10.1016/j.msea.2005.01.002.
33. Demeter A.S., Dolgikh O., Bastos A.C., Deconinck D., Lamaak S., Topa V., Deconinck J., *Multi-ion transport and reaction model used to improve the understanding of local current density measurements in presence of concentration gradients around a point current source*, Electrochimica Acta, 127, 2014, s. 45-52.

Charakterystyka wybranych stopów na osnovie Zn i Mg do zastosowań medycznych

Streszczenie

W artykule omówiono dwie grupy stopów biodegradowalnych na osnovie Zn i Mg. Porównano ich skład chemiczny i właściwości mechaniczne oraz odniesiono się do wymagań, jakie są stawiane materiałom na protezy medyczne. Przedstawiono mechanizmy korozji oraz wpływ tekstury na właściwości korozyjne stopów Zn i Mg. Na podstawie zebranych danych literaturowych dotyczących właściwości mechanicznych i korozyjnych różnych stopów na osnovie Zn i Mg zaproponowano dwa stopy, które mogą być stosowane jako materiały na biodegradowalne protezy medyczne. Praca ma charakter przeglądowy.

Słowa kluczowe: stopy biodegradowalne, protezy, cynk, magnez, właściwości mechaniczne, korozja

Characteristics of selected alloys based on Zn and Mg for medical applications

Abstract

The article discusses two groups of biodegradable alloys based on Zn and Mg. The chemical composition and mechanical properties are compared and the requirements for prosthesis materials are referred to. Corrosion mechanisms and the effect of texture on the corrosion properties of Zn and Mg alloys are presented. Based on the collected literature data on the mechanical and corrosion properties of various alloys based on Zn and Mg, two alloys are proposed that can be used as materials for biodegradable prosthesis. The work is of a review nature.

Keywords: biodegradable alloys, prosthesis, zinc, magnesium, mechanical properties, corrosion

Enzymy proteolityczne – charakterystyka, zastosowanie oraz immobilizacja

1. Wprowadzenie

Kataliza odgrywa ważną rolę w przemyśle chemicznym [1, 2]. Obecnie poszukuje się stabilnych oraz wydajnych katalizatorów, które charakteryzują się przyjaznym oddziaływaniem na środowisko naturalne, jak również nie są zbyt kosztowne. Szczególnie interesującą grupę takich materiałów stanowią biokatalizatory, które są alternatywą dla bardzo drogich, czasami szkodliwych dla otoczenia katalizatorów chemicznych. Przyjazne dla środowiska enzymy pełnią funkcję naturalnych katalizatorów. Zachowują precyzję chemiczną oraz wykazują specyficzną bioaktywność, przez co znacznie przyspieszają szybkość katalizowanych reakcji. Ich aktywność enzymatyczna zależy głównie od warunków prowadzonego procesu, temperatury czy pH [3]. W wysokich temperaturach enzymy zazwyczaj stają się nieaktywne z powodu częściowego rozpadu cząsteczki. Charakteryzują się także ograniczoną aktywnością w niesprzyjających warunkach, przez co poddaje się je różnym chemicznym bądź fizycznym metodom modyfikacji. Jedną z nich jest immobilizacja, którą wykorzystuje się w celu zwiększenia stabilności termicznej oraz wytrzymałości białek w rozpuszczalnikach organicznych, a także możliwości ich wielokrotnego użycia w kolejnych cyklach reakcyjnych. Immobilizowane enzymy poprawiają kontrolę katalizowanych reakcji oraz znajdują szerokie zastosowanie w wielu procesach. Istotnym elementem zachowania efektywności immobilizacji jest dobór odpowiedniej matrycy oraz metody unieruchomienia białka. Specyfika układu biokatalitycznego zależy od związanego z nim materiału oraz jego właściwości.

Dużym zainteresowaniem naukowców cieszą się enzymy proteolityczne (proteazy) [4], które odgrywają istotną rolę w wielu procesach, takich jak: zapłodnienie, trawienie, wzrost, dojrzewanie, starzenie się, a nawet śmierć organizmu. Enzymy te regulują liczne procesy fizjologiczne poprzez kontrolę aktywacji, syntezy oraz degradacji białek. Pełnią również istotną funkcję w replikacji oraz rozprzestrzenianiu się wirusów, bakterii i pasożytów [5, 6]. Znajdują także szerokie zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu, m.in. spożywczego, medycznego, farmaceutycznego czy chemicznego. Celem niniejszego rozdziału jest przedstawienie charakterystyki proteaz oraz przeglądu literaturowego dotyczącego immobilizacji tej grupy enzymów na różnego rodzaju nośnikach.

2. Proteazy – enzymy proteolityczne

2.1. Charakterystyka i zastosowanie

Enzymy proteolityczne ze względu na duże zróżnicowanie strukturalne charakteryzują się odmiennymi właściwościami katalitycznymi oraz mechanizmem aktywacji. Termin „proteazy” pierwszy raz pojawił się w niemieckiej literaturze dotyczącej chemii fizjo-

¹ agnieszka.kolodziejczak-radzimska@put.poznan.pl, Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej, Wydział Technologii Chemicznej, Politechnika Poznańska.

² Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej, Wydział Technologii Chemicznej, Politechnika Poznańska.

³ Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej, Wydział Technologii Chemicznej, Politechnika Poznańska.

logicznej w drugiej połowie XIX wieku – w odniesieniu do enzymów proteolitycznych [5, 6]. Enzymy rozszczepiające wiązania peptydowe występujące w białkach (z przyłączeniem cząsteczki wody) nazywa się proteazami, proteinazami bądź peptydazami [5]. Proteazy obejmują wszystkie hydrolazy, które oddziałują na białko lub dalej degradują jego fragmenty [7]. Zerwanie wiązania peptydowego następuje najczęściej przez hydrolizę, w której zużywana jest cząsteczka wody [8]. Taki rozpad wiązań jest możliwy zarówno wewnątrz łańcucha polipeptydowego, jak i na jego końcach. Ze względu na rodzaj reszt aminokwasowych wchodzących w skład proteaz, należą one do grupy enzymów o bardzo zróżnicowanej budowie centrum aktywnego [9]. Różnorodne właściwości proteaz zależą więc od rodzaju, liczby oraz lokalizacji aminokwasów znajdujących się w ich centrum aktywnym i w pobliżu rozszczepianego wiązania [5]. Charakter substratu zależy od właściwości miejsc wiążących, rozmieszczonych wzdłuż szczelin cząsteczki białka – po jednej bądź po obu stronach centrum aktywnego [6].

Proteazy można pozyskiwać z wielu organizmów żywych, np. z roślin, zwierząt, bakterii czy wirusów [5]. Do roślinnych proteaz należą bromelaina oraz papaina, które dobrze trawią białko w szerokim zakresie pH. Papaina produkowana jest z owoców papai, natomiast bromelainę pozyskuje się z liści, łodygi bądź skórki ananasa. Zarówno bromelaina, jak i papaina stosowane są w przemyśle spożywczym jako składnik preparatów zmiękczających mięso, a także w browarnictwie do klarowania piwa. Proteazy zwierzęce to najczęściej trypsyna, chymotrypsyna oraz pepsyna. Pepsyna ma kwaśny charakter, znajduje się w żołądku kręgowców, gdzie utrzymuje się jako nieaktywny prekursor. Stosowana jest w detergentach oraz w przemyśle mleczarskim do wytworzenia stabilnego twarogu. Trypsyna i chymotrypsyna są enzymami proteolitycznymi, które trawią białka w jelicie cienkim. Wytwarzane są one w trzustce jako proenzymy – trypsynogen i chymotrypsynogen (formy nieczynne), a następnie transportowane są do jelita cienkiego. Tutaj trypsynogen przekształcany jest w trypsynę przez enzym śluzówki jelita cienkiego, a z kolei trypsyna aktywuje chymotrypsynogen do chymotrypsyny. Obydwa enzymy mają silną aktywność proteolityczną. Są odpowiedzialne za rozkład białek znajdujących się w pożywieniu na drobniejsze cząstki zwane peptydami. Enzymy te wykorzystywane są w procesach analitycznych i diagnostycznych. Mikroorganizmy są odpowiedzialne za wytwarzanie zarówno wewnątrzkomórkowych, jak i zewnątrzkomórkowych proteaz. Proteazy wewnątrzkomórkowe są niezbędne w wielu metabolicznych procesach komórkowych, podczas gdy proteazy zewnątrzkomórkowe są ważne w procesie hydrolizy białkowych składników odżywczych [10, 11]. Proteazy bakteryjne, które mają zazwyczaj charakter zasadowy, wyróżniają się wyższą aktywnością w pH 8-12, a także w różnych temperaturach między 50 a 70°C. Pozyskuje się je między innymi z takich bakterii jak: *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus clausii*, *Bacillus lentus* i *Bacillus licheniformis* [10]. Proteazy wyizolowane z grzybów charakteryzują się szerokim zakresem specyficzności podłoża oraz dużą stabilnością. Stosowane są w celu modyfikacji białek spożywczych. Proteazy pozyskuje się również z różnych gatunków grzybów, są to najczęściej: *Aspergillus saitoi*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus melleus* czy *Aspergillus oryzae* [5, 9, 11].

Proteazy stanowią ok. 60% enzymów występujących na całym rynku przemysłowym [10]. Znajdują liczne zastosowania w przemyśle medycznym, farmaceutycznym oraz chemicznym ze względu na ich fundamentalną rolę w procesach biologicznych [5, 12]. Proteazy stosowane są w terapiach leczniczych oraz przeciwwirusowych. Odpowiadają

za wszelakie procesy fizjologiczne, nadzorują aktywację, syntezę oraz degradację białek [13]. Proteazy odgrywają ważną rolę w procesach regulacyjnych, w których proteoliza prowadzi do aktywacji bądź dezaktywacji białek [10, 12]. Wykorzystywane są w wielu gałęziach przemysłu, takich jak skórzany czy spożywczy, w tym mleczarski. Są używane w przetwórstwie mięsa, sera, papieru, a także w odzyskiwaniu srebra z klisz fotograficznych. Obecnie większość enzymów stosowanych w przemyśle ma charakter hydrolityczny i służą one do rozkładania różnych materiałów naturalnych [5, 10].

W tabeli 1 przedstawiono poszczególne zastosowania proteaz pozyskiwanych z różnych źródeł mikrobiologicznych.

Tabela 1. Przykładowe zastosowania proteaz pozyskiwanych z różnych źródeł mikrobiologicznych

Gatunek	Zastosowanie
<i>Aspergillus niger</i>	przemysł: spożywczy, farmaceutyczny, kosmetyczny, skórzany, detergenty; produkcja peptydów
<i>Bacillus subtilis</i>	przemysł skórzany odbiażanie odpadów skorupiaków
<i>Bacillus licheniformis</i>	ekstrakcja chityny; degradacja kurzych piór; środki do szczeciniowania
<i>Streptomyces avermectinus</i>	przemysł skórzany i kosmetyczny; produkcja żywności dla zwierząt; obróbka odpadów keratynowych
<i>Cheutomium globosum</i>	przemysł detergentów; degradacja piór; usuwanie warstwy żelatyny z kliszy rentgenowskiej

Źródło: opracowanie własne na podstawie [10].

2.2. Klasyfikacja i podział

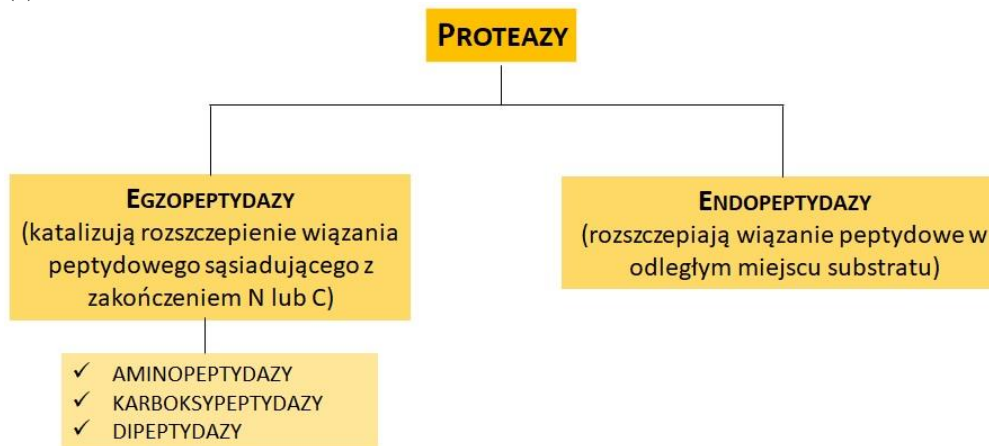
Tak jak w przypadku pozostałych enzymów, dla peptydaz obowiązuje nazewnictwo zatwierdzone przez Komitet Nomenklaturowy Międzynarodowej Unii Biochemii i Biologii Molekularnej (IUBBM, ang. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*). Prócz tej zalecanej klasyfikacji istnieje jeszcze baza danych MEROPS (<https://www.ebi.ac.uk/merops>), według której peptydazy lub proteazy są przypisane do dwóch klasyfikacji znanych jako klan i rodzina. W skład klanu peptydaz wchodzi wszystkie proteazy, które mają jedno pochodzenie ewolucyjne i mogą obejmować więcej niż jedną rodzinę peptydaz. Każdy klan jest identyfikowany dwiema literami, w których pierwsza litera reprezentuje typ katalityczny rodzin proteaz wchodzących w skład klanu, takich jak asparagin (A), cysteina (C), glutamina (G), asparagina (N), seryna (S), treonina (T), metal (M) lub reszty mieszane (P). Z kolei rodzinę proteaz definiuje się jako zestaw proteaz o homologicznych sekwencjach kwasowych, w których rodzinę identyfikuje się literą opartą na typie katalitycznym proteazy podobnej do identyfikacji klanu, po której następuje niepowtarzalny numer przypisany danemu enzymowi. Niektóre rodziny mogą być dalej podzielone na podrodziny, jeśli istnieją dowody rozbieżności w rodzinie [13].

Natomiast zgodnie z IUBBM (<https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb>) – enzymy proteolityczne przydzielone są do określonej klasy na podstawie podobieństw sekwencji aminokwasów w ich strukturze [14]. Proteazy są podklasą klasy hydrolaz i dzielą się na endopeptydazy oraz egzopeptydazy, które hydrolizują wiązania peptydowe. Egzopeptydazy dzieli się w zależności od końca łańcucha polipeptydowego, z którego uwalniany jest aminokwas. Grępuje się je na:

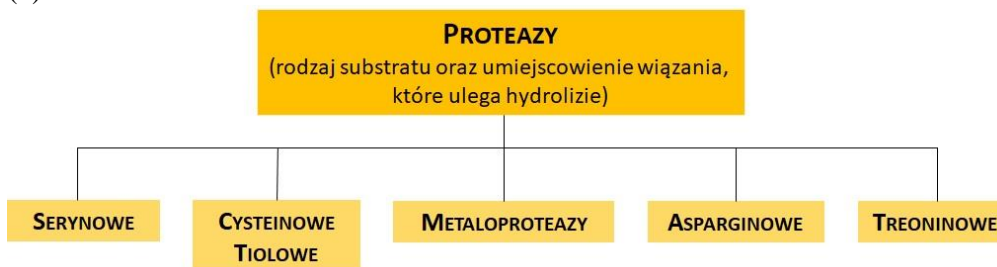
- aminopeptydazy – odcinające aminokwasy od N-końca białka;
- karboksypeptydazy – odcinające aminokwasy z C-końca łańcucha peptydowego.

Endopeptydazy rozrywają wiązania peptydowe między aminokwasami znajdującymi się wewnątrz łańcucha polipeptydowego, co skutkuje powstaniem dwóch krótszych produktów [5]. Działają one na czwarte wiązanie peptydowe znajdujące się wewnątrz łańcucha, natomiast egzopeptydazy mają możliwość działania na pierwsze, drugie bądź trzecie wiązanie peptydowe [10, 15]. Na rysunku 1 przedstawiono klasyfikację proteaz.

(a)



(b)



Rysunek 1. Klasyfikacja proteaz: (a) ze względu na miejsce działania, (b) na podstawie mechanizmu katalitycznego i obecności reszt aminokwasowych; opracowanie własne na podstawie [5]

Proteazy różnią się także ze względu na substrat i umiejscowienie wiązania, które ulega hydrolizie. Dzieli się one pod względem pH, w którym wykazują maksimum aktywności. Mechanizm samej katalizy również ulega zmianie w zależności od danej klasy [16]. W tej klasyfikacji rozróżniamy proteazy: serynowe, cysteinowe, asparaginowe, metaloproteazy, treoninowe, a także proteazy o nie do końca poznanym mechanizmie katalitycznym [12, 16, 17].

Proteazy serynowe posiadają tak zwaną diadę oraz triadę katalityczną w centrum aktywnym – składającą się z seryny, histydyny i asparaginy. Istnieją także proteazy zawierające cztery reszty aminokwasowe. Proteazy serynowe stanowią najliczniejszą grupę z wszystkich peptydaz. Charakteryzują się one alkalicznym pH, a niektóre wykazują znaczną termostabilność [9]. Mechanizm katalizy polega na ataku nukleofilowym przez grupę hydroksylową seryny na grupę karbonylową wiązania peptydowego, co prowadzi do powstania produktu pośredniego reakcji. Kiedy donorem protonu jest (zazwyczaj)

histrydyna, wymagana jest trzecia reszta aminokwasowa do utrzymania orientacji przestrzennej, natomiast gdy donorem jest lizyna, w centrum aktywnym znajduje się tylko diada katalityczna. Do proteaz serynowych należą np. trypsyna czy elastaza [12, 16].

Rozróżnia się dwa rodzaje proteaz cysteinowych: posiadające diadę lub triadę katalityczną. Diada katalityczna składa się z cysteiny oraz histydy, natomiast triada zawiera cysteinę, histydynę oraz asparaginę bądź glutaminę. Podczas katalizy następuje atak nukleofilowy cysteiny na węgiel wiązania peptydowego, który dalej przeprowadzany jest przez grupę histydy [7]. Rozpad wiązania peptydowego prowadzi do wytworzenia – pomiędzy enzymem oraz C-końcową resztą substratu – wiązania tioestrowego, które następnie poddawane jest hydrolizie z wykorzystaniem aktywnej cząsteczki wody. Z reguły proteazy cysteinowe posiadają neutralne pH. Są mniej wykorzystywane niż proteazy serynowe czy asparaginowe. Pozyskiwane są z organizmów żywych, ale również z wirusów [10, 11].

Metaloproteazy zawierają w centrum aktywnym jony magnezu i kobaltu. To one biorą bezpośredni udział w reakcji hydrolizy wiązania peptydowego. W centrum aktywnym zazwyczaj posiadają trzy reszty aminokwasowe, takie jak: histydy, glutaminian, kwas asparaginowy bądź lizyna. Najczęściej jednak znajduje się tam histydy oraz glutamina, natomiast rzadziej grupy lizyny oraz reszty kwasu asparaginowego. Podczas hydrolizy jony metalu poprzez reszty aminokwasowe aktywują cząsteczkę wody i dochodzi do zerwania wiązania peptydowego [10]. Do tej grupy enzymów należą również aminopeptydazy, takie jak termolizyna – jedna z najciekawszych metaloproteaz. Odnacza się ona znaczną aktywnością biologiczną, nawet w wysokiej temperaturze. Podczas hydrolizy rozszczepienie wiązania peptydowego następuje po N-końcowej stronie reszt aminokwasowych [7, 11].

Proteazy treoninowe to rodzina enzymów proteolitycznych zawierających resztę treoniny (Thr) w miejscu aktywnym. Odpowiadają za funkcjonowanie proteasomu, dużego aparatu rozkładającego białka. Proteazy treoninowe są aktywowane przez aminy pierwszorzędowe. Enzymy te swoją aktywność wykazują poprzez atak nukleofilowy przy pomocy reszty aminokwasowej treoniny na atom węgla, który uczestniczy w tworzeniu wiązania peptydowego [9, 12, 17].

Istnieje także szeroka gama enzymów o nie w pełni poznanym mechanizmie działania katalizy, np. peptydazy o aktywnościach biologicznych, które nie spełniają definicji endopeptydaz czy egzopeptydaz. Jednym z nich są peptydowe liazy asparaginowe, które nie przeprowadzają hydrolizy, a rozrywają wiązania peptydowe w obrębie własnej cząsteczki [9, 17]. Wiązanie peptydowe jest płaskie i bardzo stabilne, dlatego hydroliza wymaga aktywności enzymatycznej. Niektóre wiązania peptydowe są albo niestabilne energetycznie, albo mogą być tak indukowane, że następuje ich samoistny rozpad [8]. Peptydowe liazy asparaginowe posiadają w centrum katalitycznym resztę kwasu asparaginowego, który atakuje własne wiązanie peptydowe i powoduje jego rozpad. Należą do nich także inteiny, tak zwane białka zawarte w białkach, zawierające dodatkowe fragmenty charakterystyczne dla endonukleazy, która nadaje ruchliwość genetyczną DNA kodującemu inteiny [9, 16].

Proteazy asparaginowe tworzą szeroko rozpowszechnioną klasę enzymów, które wykazują różne aktywności oraz swoistości [18]. Występują wśród kręgowców, roślin, pasożytów, wszelakich grzybów czy nawet w rekombinowanych białkach pochodzenia bakteryjnego [19, 20]. Proteazy asparaginowe powiązane są z szerokim zakresem funkcji

fizjologicznych, np. z trawieniem składników odżywczych u ssaków, obroną przed patogenami, kontrolą ciśnienia krwi czy dojrzewaniem białek. Charakteryzowane są jako enzymy o podobnych właściwościach do pepsyny [18]. Aktywne enzymy asparaginowe zazwyczaj zawierają pojedynczy łańcuch peptydowy składający się z około 320-360 reszt aminokwasowych. Posiadają głównie strukturę drugorzędową nici (β -harmonijki), ułożoną w konformacji dwupłatkowej. Oba płaty są względem siebie homologiczne, a pomiędzy nimi znajduje się centrum katalityczne, które zawiera parę reszty kwasu asparaginowego, po jednej w każdym płacie – niezbędne dla aktywności katalitycznej. Aktywność enzymatyczna proteazy asparaginowej zależy głównie od reszt kwasu asparaginowego [18, 19]. Dzięki nim może nastąpić związanie oraz aktywacja cząsteczki wody podczas hydrolizy. Następuje ona za pomocą rozerwania wiązania peptydowego na skutek ataku nukleofilowego wody na miejsce aktywne enzymu. Proton pierwszej reszty kwasowej umożliwia atak nukleofilowy wody na węgiel wiązania peptydowego. Natomiast proton drugiej reszty kwasowej zostaje przyłączony do miejsca katalitycznego enzymu i tworzy się tetraedryczny związek przejściowy, co prowadzi do przyłączenia się protonu do grupy amidowej wiązania peptydowego i do jego rozpadu [19]. W proteazach asparaginowych zamiast reszty kwasu asparaginowego może również występować histydyna. Do takich enzymów należy np. pepsyna pozyskiwana z żołądków kręgowców [21]. Jest to pierwsze krystaliczne białko, które kiedykolwiek przeanalizowano za pomocą dyfrakcji promieni rentgenowskich. Pepsyna to jeden z najbardziej znanych enzymów żołądkowych, który bierze udział w trawieniu, gdzie rozpad wiązań peptydowych następuje pomiędzy aminokwasami zawierającymi w łańcuchu bocznym grupę fenyłową a aminokwasami posiadającymi dwie grupy karboksylowe [9, 19]. Większość z proteaz asparaginowych pozyskiwana jest z grzybów z rodzaju *Aspergillus*. Należą do nich: *A. oryzae*, *A. fumigatus*, *A. saitoi*, *A. awamori* i *A. niger*. Optymalne pH proteazy asparaginowej jest określane przez potencjał elektrostatyczny w centrum aktywnym, który z kolei jest determinowany przez położenie i orientację reszt kwasowych w jego pobliżu [21, 22]. Proteazy grzybowe są aktywne w zakresie pH 4–11 i wykazują szeroką specyficzność substratów. Można je podzielić na grzybowe proteazy kwasowe, neutralne oraz zasadowe. Kwasowe proteazy asparaginowe mają optymalne pH wynoszące około 4,5 i są stabilne w przedziale pH 2,5–6,0. Wykazują wysoką aktywność w formowaniu skrzepu i niską aktywność proteolityczną w odniesieniu do mleka, przez co są szczególnie przydatne w przemyśle serowarskim [23]. Neutralne proteazy, które są aktywne w pH = 7,0, uzupełniają działanie proteaz roślinnych, zwierzęcych czy bakteryjnych w zmniejszeniu goryczy hydrolizatów białek spożywczych. Zasadowe proteazy znajdują zastosowanie w modyfikacji białek spożywczych oraz jako składnik aktywny w detergentach do prania [20, 21, 24, 25].

3. Immobilizacja

Enzymy w środowisku organicznym wykazują mniejszą aktywność niż w środowisku wodnym. Poszukuje się więc metod pozwalających na zwiększenie stabilności oraz szybkości reakcji enzymatycznych. W celu bardziej ekonomicznego i skutecznego użytkowania enzymów przeprowadza się modyfikacje, zarówno w sposób fizyczny, jak i chemiczny [26]. Jedną ze skutecznych technik modyfikacji białek jest immobilizacja, podczas której następuje unieruchomienie enzymu na powierzchni lub wewnątrz wybranego nośnika [27, 28]. Jej podstawową rolą jest maksymalizacja stabilności zarówno

fizycznej, jak i enzymatycznej biokatalizatora [29]. Obecnie dąży się do poprawy stabilności, wytrzymałości oraz możliwości ponownego użycia enzymów, nawet w trudnych warunkach reakcji, takich jak ekstremalne wartości pH, wysoka temperatura czy możliwość ich zastosowania w rozpuszczalnikach organicznych. Biokatalizator otrzymywany w wyniku procesu immobilizacji przyjmuje heterogeniczną postać, przez co można go ponownie wykorzystać w następnym cyklu reakcyjnym. Takie rozwiązanie przekłada się na praktyczne zastosowanie przemysłowe. [26, 27]. Profil unieruchomionych biokatalizatorów zależy od właściwości enzymu, ale także od rodzaju materiału związanego z nim nośnika [30].

Istnieją różnorodne metody procesu immobilizacji enzymów, które różnią się ze względu na rodzaj, siłę oraz trwałość oddziaływań, jakie powstają pomiędzy biokatalizatorem a matrycą. W obecności nośnika biokatalizator może być związany na powierzchni układu lub – poprzez „uwięzienie” – wewnątrz matrycy [31, 32]. Najczęściej stosowane są techniki opierające się na immobilizacji fizycznej, czyli metodzie adsorpcyjnej i pułapkowaniu oraz na immobilizacji chemicznej, czyli na wiązaniu kowalencyjnym oraz sieciowaniu [29]. Metody fizyczne polegają na tworzeniu słabych, niespecyficznych oddziaływań wodorowych, hydrofobowych, elektrostatycznych, jonowych, a także oddziaływań van der Waalsa [7]. Natomiast metody chemiczne polegają na wytworzeniu trwałych i stabilnych wiązań, takich jak estrowe bądź peptydowe, pomiędzy enzymem a nośnikiem [33].

Przemysłowe znaczenie immobilizowanych enzymów wynika głównie z uzyskanych przez nie właściwości, ponieważ muszą mieć one przewagę nad natywnymi enzymami czy katalizatorami chemicznymi [29, 34, 35]. W większości przypadków aktywność immobilizowanych enzymów spada w porównaniu do ich form natywnych. Przyczyną tego jest usztywnienie struktury białkowej oraz pojawianie się oporów dyfuzyjnych w swobodnym transporcie substratów i produktów do i z centrum aktywnego. Jednak ostatnie wyniki badań wskazują na wzrost aktywności immobilizowanych białek. W niektórych przypadkach odnotowano nawet ich nadaktywność, czyli wzrost bioaktywności w stosunku do formy natywnej [31]. Wydajność unieruchomionego enzymu zależy głównie od metod immobilizacji oraz od ilości użytego białka. Kinetyka reakcji może drastycznie zmaleć poprzez ograniczenia dyfuzji, co sprawia, że immobilizowany enzym wykazuje mniejszą aktywność katalityczną [28, 29]. Pomimo spadku aktywności immobilizowanego enzymu poprawia się jego stabilność w różnych warunkach pH i temperatury, co rekompensuje spadek aktywności, dając w rezultacie ogólną korzyść procesu immobilizacji [30, 36, 37]. W przemyśle istotne znaczenie mają koszty prowadzonych procesów. Na koszt wytworzenia odpowiedniego biokatalizatora głównie przekłada się cena nośnika, która często jest podstawą całkowitego kosztu procesu immobilizacji [33]. Ważne jest, żeby cena wytworzenia czy pozyskania nośnika nie przekraczała ceny samego enzymu [31, 35]. W tabeli 2 przedstawiono najważniejsze zalety oraz wady immobilizowanych enzymów.

Tabela 2. Najważniejsze wady i zalety immobilizowanych enzymów

Zalety	Wady
Lepsza stabilność, zwłaszcza w rozpuszczalnikach organicznych oraz w wyższej temperaturze	Niższa aktywność enzymatyczna w porównaniu do enzymu pierwotnego – przez efekty przenoszenia masy

Łatwa separacja biokatalizatora	Niższa szybkość reakcji w porównaniu do enzymu pierwotnego
Możliwość wielokrotnego użycia biokatalizatora (recykling)	Dodatkowe koszty związane z wytworzeniem nośnika
Zmniejszone koszty dalszego przetwarzania	Możliwe obniżenie wydajności

Źródło: opracowanie własne na podstawie [30].

3.1. Nośniki w procesie immobilizacji

Jednym z istotnych elementów procesu immobilizacji jest dobór odpowiedniego nośnika. Interakcja między nośnikiem a enzymem nadaje immobilizowanemu białku określone właściwości mechaniczne, chemiczne, biochemiczne oraz kinetyczne. Specyficzność matrycy ma kluczowe znaczenie w określaniu skuteczności układu biokatalitycznego. Wybór optymalnego materiału jest więc istotny w procesie immobilizacji, dzięki czemu właściwości zarówno enzymu, jak i nośnika odpowiedzialne są za charakter uzyskanego układu. Nie ma natomiast uniwersalnej matrycy, która byłaby odpowiednia dla wszystkich enzymów [35]. Ważne jest, aby była obojętna i nie wpływała znacznie na parametry kinetyczne enzymu. Równie istotne jest, by nośnik nie zmieniał środowiska w pobliżu cząsteczki enzymu [26]. Charakter hydrofilowy lub hydrofobowy matrycy wpływa na typ, siłę oddziaływania niekowalencyjnego oraz na adsorpcję w procesie immobilizacji [30]. Idealnymi właściwościami nośników są: fizyczna odporność na ściskanie, hydrofilowość oraz obojętność na środowisko [27, 33, 38]. Istotna jest także biokompatybilność, łatwa dostępność, a także niski koszt ich pozyskiwania. Ponadto do prawidłowego sprzężenia z białkami na powierzchni nośników potrzebne są liczne grupy reaktywne i łańcuchy hydrofilowe. Najważniejszą funkcją matrycy jest wysokie powinowactwo w stosunku do zastosowanego enzymu, dlatego nośnik powinien charakteryzować się dobrymi właściwościami sorpcyjnymi [39, 40]. Ochronny charakter matrycy zapewnia odporność układów biokatalitycznych na zmiany parametrów środowiska, takich jak temperatura oraz pH. To ostatecznie sprowadza się do lepszej stabilności operacyjnej unieruchomionych enzymów [26, 27]. Istotna jest także stabilność mechaniczna, sztywność, nietoksyczność oraz biodegradowalność zastosowanych układów nośnych [33]. Wykorzystanie różnych rodzajów nośników zapewnia lepszą przydatność do ich ponownego użycia, co w rezultacie skutkuje obniżeniem kosztów w procesach przemysłowych [27, 33].

W celu ułatwienia wytworzenia stabilnych oddziaływań między nośnikiem a enzymem wykorzystuje się związki pośrednie, które pełnią funkcję modyfikatorów powierzchni nośnika. Wytwarzają one nowe ugrupowania, umożliwiając łatwiejsze przyłączenie enzymu, a także zwiększają stabilizację struktury białka. Modyfikatory powierzchni zawierają co najmniej dwie reaktywne grupy funkcyjne, odpowiednio przeznaczone dla matrycy oraz dla enzymu. Są to najczęściej ugrupowania karbonylowe, aminowe, epoksydowe lub tiolowe [7]. W tabeli 3 przedstawiono przykładowe nośniki najczęściej stosowane w procesie immobilizacji enzymów.

Tabela 3. Przykładowe nośniki, ich właściwości oraz immobilizowane na nich enzymy

Rodzaj nośnika	Przykład	Właściwości nośnika	Przykłady immobilizowanych enzymów
Materiały nieorganiczne	Tlenki nieorganiczne (np. SiO ₂ , ZrO ₂ , MgO, Fe ₂ O ₃)	Wysoka stabilność mechaniczna, chemiczna, duża pojemność sorpcyjna	Lipaza, ureaza, amylaza
	Minerały (np. kaolin, halozyt, bentonit)	Biokompatybilność, hydrofobowość, obecność grup funkcyjnych (np. –OH, COOH, C=O, –SH, –NH ₂)	Lipaza, amylaza, tyrozynaza, oksydaza glukozowa
	Materiały węglowe (np. grafen, tlenek grafenu, węgiel drzewny)	Biodegradowalność, dwuwymiarowa struktura, duża powierzchnia właściwa	Papaina, glukozydaza, lipaza, peroksydaza
Materiały organiczne	Syntetyczne polimery (np. poliamid, alkohol poliwinylowy, polipropylen)	Obecność grup funkcyjnych	Amylaza, lipaza, laktaza
	Biopolimery (np. chitozan, chityna, celuloza)	Biokompatybilność, nietoksyczność, biodegradowalność	Lipaza, amylaza

Źródło: opracowanie własne na podstawie [30].

3.2. Immobilizowane proteazy

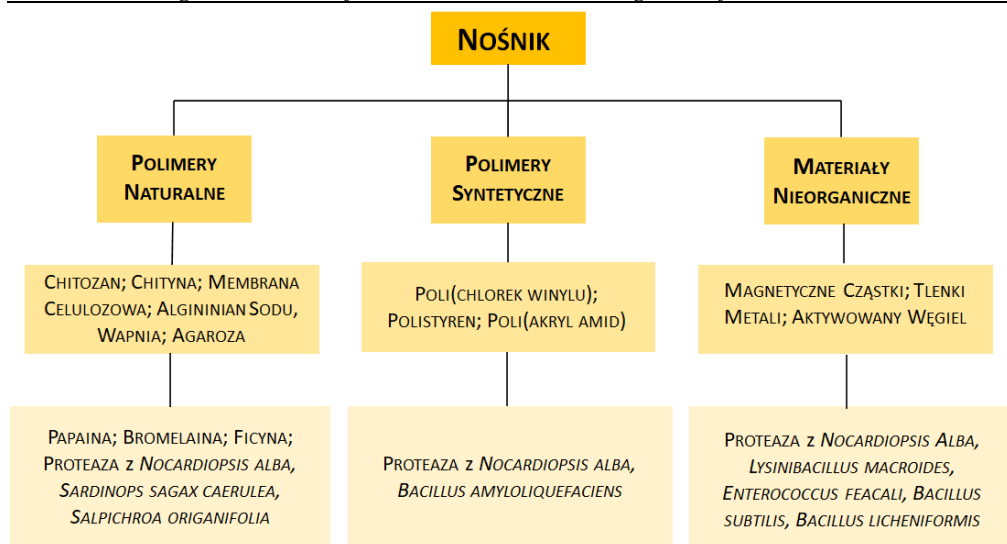
Specyficzne właściwości enzymów proteolitycznych sprzyjają wykorzystaniu ich w reakcjach katalitycznych, jednak jednocześnie kwestionuje się ich stabilność oraz możliwość odzyskania ich ze środowiska reakcji. Wysoka wydajność katalityczna czy zwiększona termostabilność są wysoce pożądane w produkcji na szeroką skalę. Na wydajność katalityczną enzymu szczególnie wpływ ma temperatura, w jakiej prowadzona jest reakcja. Stosuje się więc proces immobilizacji, który zapewnia optymalną wydajność katalityczną oraz opłacalne wykorzystanie w procesach przemysłowych. Zaletą immobilizacji proteaz jest możliwość kontroli zachodzącego procesu oraz wyraźna redukcja jego kosztów. Z uwagi na różnorodność ich właściwości – istotny jest dobór odpowiedniej metody immobilizacji oraz materiału nośnego. Priorytetem jest więc zachowanie aktywności katalitycznej białka, trwałości oraz zwiększonej stabilności [10].

W ostatnich pracach badawczych można zauważyć znaczące korzyści z unieruchamiania proteaz z różnych źródeł na wszelakich materiałach nośnych. Materiały polimerowe (zarówno naturalne, jak i syntetyczne) bardzo często są stosowane jako nośniki w procesie immobilizacji enzymów, w tym proteaz [38, 41-47]. Thakrar i Singh [38] zastosowali kilka rodzajów materiałów polimerowych (m.in. chityna, chitozan, membrana nanocelulozowa, algininian sodu, PVC, akryloamid, polistyren) w celu immobilizacji alkalicznej proteazy z *Nocardiopsis alba*. W swoich badaniach porównali różne techniki immobilizacji, określając ich wpływ na wydajność immobilizacji oraz aktywność katalityczną. Oprócz materiałów polimerowych Thakrar i Singh użyli również materiałów nieorganicznych (np. żel krzemionkowy czy tlenek glinu) jako nośników dla proteazy z *Nocardiopsis alba*. Z kolei Chatterjee [41] w swoich badaniach przeprowadził immobilizację proteazy wyizolowanej z *Bacillus licheniformis* na karagenianie, alginianie

wapnia, żelatynie oraz żelu poliakrylamidowym, stosując metodę pułapkowania. Tego samego rodzaju proteaza została również unieruchomiona na chitozanie aktywowanym aldehydem glutarowym, glioksalowym, a także sulfonem diwinylowym [42]. W kolejnych badaniach zimmobilizowano proteazę pochodzącą z *Salpichroa organifolia* oraz papainę – odpowiednio na agarozie oraz membranie celulozowej za pomocą wiązania kowalencyjnego [43, 44]. W jednej z ostatnio opublikowanych prac pokazano, jak produkty uboczne z owoców morza (odpady z trzewi ryb i główek krewetek) można wykorzystać jako materiał wyjściowy do zaprojektowania unieruchomionego układu katalitycznego, co daje możliwość generowania narzędzi do bioprzetwarzania [45]. Z odpadów tych wyizolowano chitynę, którą w dalszej kolejności wykorzystano jako nośnik dla proteazy pochodzącej z *Sardinops sagax caerulea*. Natomiast Holyavka i współpracownicy [46] zsyntetyzowali chitozan, na którym zimmobilizowali trzy rodzaje proteaz cysteinowych: bromelainę, papainę oraz ficynę.

Wyniki zaprezentowane w powyższych pracach pokazują, że zarówno polimery naturalne, jak i syntetyczne mogą być z powodzeniem stosowane jako nośniki proteaz różnego pochodzenia. Uzyskane parametry immobilizacji oraz aktywność katalityczna zależą zarówno od rodzaju nośnika, jak i zastosowanej metody immobilizacji.

Oprócz materiałów polimerowych dużym zainteresowaniem cieszą się również układy nieorganiczne (np. tlenki metali, materiały węglowe), które są również wykorzystywane w procesie immobilizacji proteaz [38, 48-54]. Opublikowane do tej pory dane pokazują, że bardzo często jako nośniki proteaz stosowane są magnetyczne nanocząstki w postaci tlenków metali. Dzięki aktywności magnetycznej mikrocząstek odpowiednich tlenków enzym może być łatwo usuwany z układu reakcyjnego za pomocą zwykłego magnesu. Właściwości mikrocząstek magnetycznych umożliwiają wielokrotne użycie enzymu oraz jego długotrwałą stabilność [49-52]. Dodatkowo modyfikacja cząstek magnetycznych ułatwia związanie enzymu z powierzchnią nośnika. Sahu i współpracownicy [49] sfunkcjonalizowali magnetyczne cząstki żelaza aminosilanem, a następnie zimmobilizowali na ich powierzchni proteazę wyizolowaną z *Bacillus subtilis*. Magnetyczne cząstki żelaza zastosowali również w swoich badaniach Valek i współpracownicy [50], którzy bezpośrednio na cząstkach żelaza metodą adsorpcyjną zimmobilizowali proteazę pochodzącą z *B. licheniformis*. Z kolei Glomm i współpracownicy [52] unieruchomili subtilizynę A na modyfikowanych magnetycznych cząstkach krzemionki. Oprócz typowych magnetycznych cząstek również inne tlenki mogą stanowić podłoże do unieruchomienia proteaz [37, 53, 54]. Dotychczas opublikowane badania pokazują użycie tlenku glinu (proteaza z *Nocardiopsis alba*), krzemu (proteaza z *Bacillus subtilis*) oraz cynku (proteaza – brak źródła) jako podłoża dla proteaz różnego pochodzenia. Otrzymane w ten sposób układy biokatalityczne mogą być z powodzeniem stosowane w różnych gałęziach przemysłu (spożywczy, kosmetyczny, skórzany itp.). Na rysunku 2 zaprezentowano przykładowe nośniki wykorzystane do tej pory w procesie immobilizacji proteaz.



Rysunek 2. Przykładowe nośniki stosowane w procesie immobilizacji proteaz różnego pochodzenia; opracowanie własne

4. Podsumowanie

Treść prezentowanego rozdziału zawiera informacje dotyczące ogólnej charakterystyki proteaz – ich klasyfikację, pochodzenie oraz zastosowanie. Istotnym elementem prezentowanych informacji było pokazanie sposobów immobilizacji proteaz różnego pochodzenia. W związku z dynamicznym rozwojem procesów technologicznych, które skutkują poszukiwaniem ekologicznych oraz efektywnych katalizatorów, trwają intensywne badania nad unieruchomieniem proteaz. Uzyskane wyniki pokazują, że efektywność immobilizacji proteaz w głównej mierze warunkowana jest rodzajem zastosowanej matrycy. Opublikowane w ostatnich latach badania prezentują szereg materiałów, które z powodzeniem mogą być stosowane jako podłoża dla tego typu enzymów. Jak przedstawiono w niniejszym rozdziale, najczęściej stosowane są materiały organiczne (polimery naturalne i syntetyczne) oraz nieorganiczne (głównie tlenki metali, w tym magnetyczne cząstki). Dodatkowo istotny element stanowi dobór odpowiedniej metody immobilizacji w celu skuteczniejszego związania proteazy z powierzchnią nośnika. W związku z tym wykorzystywane w badaniach materiały są dodatkowo modyfikowane poprzez utworzenie na ich powierzchni określonych grup funkcyjnych, które wykazują powinowactwo do enzymu. Podsumowując treść rozdziału, można stwierdzić, że badania dotyczące immobilizacji proteaz cieszą się dużym zainteresowaniem i cały czas są rozwijane, dzięki czemu pozwalają uzyskać układ biokatalityczny na bazie proteaz z wysoką aktywnością enzymatyczną. Rozwój tego typu badań z pewnością będzie stanowił istotne wsparcie dla zaawansowanych procesów biotechnologicznych.

Podziękowania

Badania zostały sfinansowane przez Ministerstwo Edukacji i Nauki w ramach subwencji dla Politechniki Poznańskiej nr 0912/SBAD/2206.

Literatura

1. Jayakumar M., Karmegam N., Gundupalli M.P., Gebeyehu K.B., Asfaw B.T., Change S.W., Ravindrane B., Awasthi M.K., *Heterogeneous base catalysts. Synthesis and application for biodiesel production – A review*, Bioresource Technology, 331, 2021, s. 125054.
2. Deuss P.J., Barta K., de Vries J.G., *Homogeneous catalysis for the conversion of biomass and biomass-derived platform chemicals*, Catalysis Science & Technology, 4, 2014, s. 1174-1196.
3. Burton S., Cowan D., Woodley J., *The search for the ideal biocatalyst*, Nature Biotechnology, 20, 2002, s. 37-45.
4. Sellami K., Couvert A., Nasrallah N., Maachi R., Abouseouda M., Amrane A., *Peroxidase enzymes as green catalysts for bioremediation and biotechnological applications. A review*, Science of The Total Environment, 806, 2022, s. 150500.
5. Mótýán A.J., Tóth F., Tózsér J., *Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology*, Biomolecules, 3, 2013, s. 923-942.
6. Beynon R., Bond J.S., *Proteolytic enzymes. A practical approach*, Oxford University Press, Oxford 2001, s. 1-5.
7. Sirisha V.L., Jain A., Jain A., *Enzyme immobilization. An overview on methods, support material, and applications of immobilized enzymes*, Advances in Food and Nutrition Research, 79, 2016, s. 179-211.
8. Rawlings N.D., *Twenty-five years of nomenclature and classification of proteolytic enzymes*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Proteins and Proteomics, 1868, 2020, s. 140345.
9. Ciesielska M., Misztal L., Luciński R., Adamiec M., *Proteazy i inne molekularne nożyce do cięcia białek*, Edukacja Biologiczna i Środowiskowa, 3, 2017, s. 12-19.
10. Naveed M., Nadeem F., Mehmood T., Bilal M., Anwar Z., Amjad F., *Protease – a versatile and ecofriendly biocatalyst with multi-industrial applications. An updated review*, Catalysis Letters, 151, 2020, s. 307-323.
11. Tokarzewicz A., Gorodkiewicz E., *Proteazy: znaczenie, rola i oznaczanie*, Chemik, 2, 2015, s. 81-88.
12. Shankar R., Upadhyay P.K., Kumar M., *Protease enzymes: highlights on potential of proteases as therapeutics agents*, International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 27, 2021, s. 1281-1296.
13. Azrin N.A.M., Ali M.S.M., Abd Rahman R.N.Z.R., Oslan S.N., Noor N.D.M., *Versatility of subtilisin. A review on structure, characteristics and applications*, Biotechnology and Applied Biochemistry, 69(6), 2022, s. 1-18.
14. Tao Z., Dong B., Teng Z., Zhao Y., *The classification of enzymes by deep learning*, IEEE Access, 8, 2020, s. 89802-89811.
15. Gorodkiewicz E., Regulska E., *SPR imaging biosensor for aspartyl cathepsins. Sensor development and application for biological material*, Protein & Peptide Letters, 9, 2010, s. 1148-1154.
16. Dunaevsky Y.E., Popova V.V., Semenova T.A., Beliakova G.A., Belozersky M.A., *Fungal inhibitors of proteolytic enzymes. Classification, properties, possible biological roles, and perspectives for practical use*, Biochimie, 101, 2014, s. 10-20.
17. Bender M.L., Kézdy F.J., *Mechanism of action of proteolytic enzymes*, Annual Review of Biochemistry, 34, 1965, s. 49-76.
18. Claverie-Martin F., Vega-Hernández M.C., *Aspartic proteases used in cheese making*, Industrial Enzymes. Structure, Function and Applications, Springer, Dordrecht 2007, s. 207-219.
19. Davies D.R., *The structure and function of the aspartic proteinases*, Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry, 19, 1990, s. 189-215.

20. Simões I., Faro C., *Structure and function of plant aspartic proteinases*, European Journal of Biochemistry, 11, 271, 2004, s. 2067-2075.
21. Yoshida F., Nagasawa M., *Studies on the proteolytic enzymes of black Aspergilli*, part 2: *Several properties of the crystalline proteolytic enzyme obtained from Aspergillus Saitoi*, Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan, 1, 1956, s. 252-266.
22. Ichishima E., Yoshida F., *N- and C-terminal residues in the acid proteinase of Aspergillus saitoi*, The Journal of Biochemistry, 2, 1966, s. 183-185.
23. Tanaka N., Takeuchi M., Ichishima E., *Purification of an acid proteinase from Aspergillus saitoi and determination of peptide bond specificity*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA), 2, 1977, s. 406-416.
24. Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V., *Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases*, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 3, 1998, s. 597-635.
25. Hajji M., Kanoun S., Nasri M., Neji G., *Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated Aspergillus clavatus ES1*, Process Biochemistry, 5, 2007, s. 791-797.
26. Banczerz R., Ginalska G., *Środowisko niewodne – miejsce katalizy enzymatycznej*, Biotechnologia, 4, 2009, s. 168-182.
27. Sharma A., Thatai K.S., Kuthiala T., Singh G., Arya S.K., *Employment of polysaccharides in enzyme immobilization*, Reactive and Functional Polymers, 167, 2021, s. 1-17.
28. Weetall H.H., *Immobilized enzymes*, Analytical Chemistry, 7, 1974, s. 602-615.
29. Basso A., Serban S., *Industrial applications of immobilized enzymes. A review*, Molecular Catalysis, 479, 2019, s. 1-17.
30. Zdarta J., Meyer A.S., Jesionowski T., Pinelo M., *A general overview of support materials for enzyme immobilization. Characteristics, properties, practical utility*, Catalysts, 8, 2018, s. 92.
31. Cacicedo M.L., Manzo R.M., Municoy S., Bonazza H.L., Islan G.A., Desimone M., Bellino M., Mammarella E.J., Castro G.R., *Immobilized enzymes and their applications*, [w:] *Biomass, Biofuels, Biochemicals. Advances in Enzyme Technology*, Elsevier, Oxford–Cambridge 2019, s. 169-194.
32. Bakula Z., Stachowiak R., Wiśniewski J., Granicka L., Bielecki J., *Immobilizacja komórek – znaczenie biomedyczne*, Postępy Mikrobiologii, 3, 2013, s. 233-245.
33. Mohamad N.R., Marzuki N.H.C., Buang N.A., Huyop F., Wahab R.A., *An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes*, Biotechnology and Biotechnological Equipment, 2, 2015, s. 1-11.
34. Liese A., Hilterhaus L., *Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications*, Chemical Society Reviews, 15, 2013, s. 6236-6249.
35. DiCosimo R., McAuliffe J., Poulouse A.J., Bohlmann G., *Industrial use of immobilized enzymes*, Chemical Society Reviews, 15, 2013, s. 6437-6474.
36. D'Souza S.F., *Immobilized enzymes in bioprocess*, Current Science, 1, 1999, s. 69-79.
37. Jesionowski T., Zdarta J., Krajewska B., *Enzyme immobilization by adsorption. A review*, Adsorption, 20, 2014, s. 801-821.
38. Thakrar F.J., Singh S.P., *Catalytic, thermodynamic and structural properties of an immobilized and highly thermostable alkaline protease from a haloalkaliphilic actinobacteria, Nocardiopsis alba TATA-5*, Bioresource Technology, 278, 2019, s. 150-158.
39. Jankowska K., Su Z., Zdarta J., Jesionowski T., Pinelo M., *Synergistic action of laccase treatment and membrane filtration during removal of azo dyes in an enzymatic membrane reactor upgraded with electrospun fibers*, Journal of Hazardous Materials, 435, 2022, s. 129071.
40. Zdarta J., Jankowska K., Strybel U., Marczak L., Nguyen L.N., Oleskiewicz-Popiel P., Jesionowski T., *Bioremoval of estrogens by laccase immobilized onto polyacrylonitrile/*

- polyethersulfone material. *Effect of inhibitors and mediators, process characterization and catalytic pathways determination*, Journal of Hazardous Materials, 432, 2022, s. 128688.
41. Chatterjee S., *Production and estimation of alkaline protease by immobilized Bacillus licheniformis isolated from poultry farm soil of 24 Parganas and its reusability*, Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research, 6, 2015, s. 2-6.
42. Santos K.P., Mellinger-Silva C., Brigida A.I.S., Barros Goncalves L.R., *Modifying alcalase activity and stability by immobilization onto chitosan aiming at the production of bioactive peptides by hydrolysis of tilapia skin gelatin*, Process Biochemistry, 97, 2020, s. 27-36.
43. Rocha G.F., Kise F., Rosso A.M., Parisi M.G., *Potential antioxidant peptides produced from whey hydrolysis with an immobilized aspartic protease from Salpichroa origanifolia fruits*, Food Chemistry, 237, 2017, s. 350-355.
44. Monte-Martínez A., González-Bacerio J., Cutiño-Avila B., Rojas J., Chappéa M., Salas-Sarduya E., Pascuala I., Guisán J.M., *Rational design and synthesis of affinity matrices based on proteases immobilized onto cellulose membranes*, Preparative Biochemistry and Biotechnology, 47, 2017, s. 745-753.
45. Salazar-Leyva J.A., Lizardi-Mendoza J., Ramirez-Suarez J.C., Lugo-Sanchez M.E., Valenzuela-Soto E.M., Ezquerro-Brauer J.M., Castillo-Yanez F.J., Pacheco-Aguilar R., *Catalytic and operational stability of acidic proteases from Monterey sardine (Sardinops Sagax Caerulea) immobilized on a partially deacetylated chitin support*, Journal of Food Biochemistry, 41, 2017, s. 12287.
46. Holyavka M., Faizullin D., Koroleva V., Olshannikova S., Zakhartchenko N., Zuev Y., Kondratyev M., Zakharova E., Artyukhov V., *Novel biotechnological formulations of cysteine proteases, immobilized on chitosan. Structure, stability and activity*, International Journal of Biological Macromolecules, 180, 2021, s. 161-176.
47. Sarathi M., Doraiswamy N., Pennathur G., *Enhanced stability of immobilized keratinolytic protease on electrospun nanofibers*, Preparative Biochemistry and Biotechnology, 49, 2019, s. 695-703.
48. Pounsamy M., Somasundaram S., Palanivel S., Balasubramani R., Chang S.W., Nguyen D.D., Ganesan S., *A novel protease-immobilized carbon catalyst for the effective fragmentation of proteins in high-TDS wastewater generated in tanneries. Spectral and electrochemical studies*, Environmental Research, 172, 2019, s. 408-419.
49. Sahu A., Badhe P.S., Adivarekar R., Ladole M.R., Pandit A.B., *Synthesis of glycinamides using protease immobilized magnetic nanoparticles*, Biotechnology Reports, 12, 2016, s. 13-25.
50. Valek T., Valkova P., Pohanka M., *Colorimetric method for the determination of proteins using immobilized microbial protease and a smartphone camera*, Analytical Letters, 54, 2021, s. 1023-1037.
51. Maharaja P., Magthalin C.J., Mahesh M., Lakshmi L.S., Swarnalatha S., Sekaran G., *Treatment of tannery saline wastewater by using effective immobilized protease catalyst produced from salt tolerant Enterococcus faecalis*, Journal of Environmental Chemical Engineering, 5, 2017, s. 2042-2055.
52. Glomm W.R., Wyshet S.G., Lindberg D., Dankel K.R., Afseth N.K., Stenstad P.M., Johnsen H., *Immobilized protease on magnetic particles for enzymatic protein hydrolysis of poultry by-products*, LWT – Food Science and Technology, 152, 2021, s. 112327.
53. Murugappan G., Khambhaty Y., Sreeram K.J., *Protease immobilized nanoparticles. A cleaner and sustainable approach to dehairing of skin*, Applied Nanoscience, 10, 2020, s. 213-221.
54. Bernal C., Guzman F., Illanes A., Wilson L., *Selective and eco-friendly synthesis of lipoaminoacid-based surfactants for food, using immobilized lipase and protease biocatalysts*, Food Chemistry, 239, 2018, s. 189-195.

Enzymy proteolityczne – charakterystyka, zastosowanie oraz immobilizacja

Streszczenie

W niniejszym rozdziale przedstawiono charakterystykę, podział oraz zastosowanie proteaz różnego pochodzenia. Proteazy stanowią 60% obecnych na rynku enzymów i powodują rozpad wiązania peptydowego w białkach oraz peptydach. Są one istotne z punktu widzenia przeżycia i śmierci wszystkich organizmów, ponieważ wpływają m.in. na replikację i transkrypcję DNA, proliferację komórek, neurogenezę, krzepnięcie krwi i procesy starzenia się. Istotnym elementem niniejszej publikacji było przedstawienie informacji dotyczących immobilizacji proteaz. Związane jest to z przemysłowym zastosowaniem enzymów, ponieważ unieruchomienie enzymu umożliwia kontrolę procesu, w którym bierze udział, a także wyraźnie redukuje jego koszty. Na podstawie przeglądu literaturowego zauważono, że magnetyczne tlenki metali oraz polimery (zarówno naturalne, jak i syntetyczne) cieszą się największą popularnością jako nośniki dla proteaz. Użycie tego typu materiałów ułatwia separację układu biokatalitycznego ze środowiska reakcji oraz zapewnia długotrwałą stabilność immobilizowanej proteazy. Otrzymane na tej bazie układy biokatalityczne bardzo dobrze sprawdzają się jako katalizatory w różnego rodzaju procesach technologicznych. Istotnym elementem w otrzymywaniu tego typu układów jest dobór odpowiedniego nośnika oraz metody immobilizacji, które znacząco wpływają na właściwości otrzymanego materiału.

Słowa kluczowe: proteazy, immobilizacja, nośnik

Proteolytic enzyme – characteristic, application and immobilization

Abstract

The characteristics, classification, and application of various origins of proteases are presented in this chapter. Proteases constitute 60% of enzymes available on the market and cause the breakdown of peptide bonds in proteins and peptides. They are important for the survival and death of all organisms, because they affect DNA replication and transcription, cell proliferation, neurogenesis, blood clotting, and aging. The key element of this publication was to show information about immobilized proteases. Because immobilized enzymes control the appropriate process and significantly reduce its costs. On the basis of the literature review, it was noticed that magnetic metal oxides and polymers (both natural and synthetic) are the most popular carriers for proteases. The use of this type of material facilitates the separation of the biocatalytic system from the reaction environment and ensures long-term stability of the immobilized protease. The obtained biocatalytic systems work very well as catalysts in various types of technological processes. The selection of the appropriate carrier and methods of immobilization have a significant effect on the properties of the obtained biocatalytic system and is an important element in the obtaining of this type of systems.

Keywords: proteases, immobilization, support

Zastosowanie glukozylotransferazy cyklodekstrynowej (CGTazy) immobilizowanej na nośniku polimerowym do produkcji cyklodekstryn

1. Wprowadzenie

Glukozylotransferaza cyklodekstrynowa (CGTaza) EC 2.4.1.19 stosowana jest do biotransformacji skrobi w cykliczne oligosacharydy, powszechnie znane jako cyklodekstryny (CD) [1]. Enzym jest przyjazny dla środowiska i łatwy w zastosowaniu. CGTaza katalizuje głównie 3 rodzaje reakcji: reakcję dysproporcjonowania, która przenosi liniowy łańcuch oligosacharydowy do innej liniowej cząsteczki oligosacharydu, powodując powstanie szeregu cząsteczek cukrów o różnych rozmiarach, reakcję hydrolytyczną, gdy woda działa jako akceptor, a także cyklizację [2].

Cyklodekstryny znane jako α -, β - i γ - składają się odpowiednio z 6, 7 i 8 reszt glukozywych połączonych wiązaniami α -1,4-acetalowymi, tworzących razem strukturę cykliczną [3]. W wyniku reakcji katalizowanych dostępnymi enzymami otrzymuje się zazwyczaj 3 główne produkty α -, β - i γ -CD w proporcjach ściśle zależnych od użytego enzymu. Każda CGTaza ma swój własny, charakterystyczny stosunek produktów $\alpha : \beta : \gamma$ w reakcji [4]. Zazwyczaj jednak najmniej otrzymywanych jest γ -cyklodeksyryn [5].

W pierścieniu cyklodekstryny wszystkie jednostki glukopiranozowe występują w konformacji krzesłowej, powoduje to, że pierwszorzędowe grupy hydroksylowe znajdują się po jednej stronie pierścienia, a drugorzędowe po przeciwnej stronie pierścienia. Cząsteczka przybiera kształt ściętego stożka, tzw. toroidu. Wnętrze toroidu posiada cechy hydrofobowe natomiast z zewnątrz cyklodekstryny są hydrofilowe i z tego powodu dobrze rozpuszczalne w wodzie [6]. Główną różnicą między poszczególnymi CD jest wielkość niepolarniej wnęki i rozpuszczalność w wodzie [7]. Dzięki hydrofobowości wnętrza cyklodekstryny tworzą kompleksy inkluzyjne ze związkami hydrofobowymi. Są to kompleksy typu „gospodarz-gość”, w których cyklodekstryna pełni funkcję gospodarza, a gościem jest kompleksowany związek hydrofobowy. Otrzymany w ten sposób kompleks jest nadal rozpuszczalny w rozpuszczalnikach polarnych, np. w wodzie. Dzięki tym właściwościom cyklodekstryny znalazły bardzo szerokie zastosowanie w farmacji, kosmologii, przemyśle spożywczym oraz w różnych dziedzinach chemii.

Szczególnie cenne są γ -CD ze względu na większy rozmiar wnęki, wyższą rozpuszczalność w wodzie, większą biodostępność i mniejszą toksyczność [8, 9]. Potencjalna zdolność γ -CD nie została dotychczas szeroko zbadana ze względu na niską wydajność ich otrzymywania, wysoki koszt, brak γ -CGTazy o wysokiej aktywności i selektywności.

Podejmowano wiele prób pozyskania wysokospecyficznych szczepów bakteryjnych wytwarzających γ -CGTazy z wyższą wydajnością [10-12] lub opracowania optymalnych warunków reakcji [13-15].

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

Immobilizację enzymów wykonuje się głównie w celu przeniesienia zalet katalizy heterogenicznej na rozpuszczalne katalizatory enzymatyczne [16]. Unieruchomienie enzymów posiada wiele zalet jak i wad [17]. Do zdecydowanych zalet immobilizacji należą między innymi: możliwość użycia enzymu w wielu cyklach reakcji lub w procesach ciągłych, łatwiejsze oddzielenie produktów oraz zwiększenie stabilności w szerszym zakresie pH i temperatury [18]. Wśród głównych wad wymienić można dodatkowe koszty związane z produkcją i aktywacją nośnika oraz reakcją immobilizacji, utratę bądź zmniejszenie aktywności, a także ograniczenie dyfuzji [19]. W literaturze opisano wiele metod immobilizacji w zależności od rodzaju utworzonych wiązań: kowalencyjne, adsorpcyjne, mikrokapsułkowanie, uwięzienie w matrycy, sieciowanie, odwracalne i nieodwracalne [20, 21]. Zastosowano szereg materiałów w celu unieruchamiania enzymów: organiczne, nieorganiczne, naturalne czy syntetyczne [22, 23]. Poszczególne immobilizacje posiadają swoje zalety i wady, dlatego dla każdego enzymu i każdego substratu zaleca się dobrać odpowiedni nośnik i metodę immobilizacji.

Trwałym, a jednocześnie posiadającym wiele zalet, sposobem immobilizacji enzymu na nośniku jest wiązanie kowalencyjne. Ten typ wiązania zapobiega oderwaniu enzymu od nośnika mimo jego ekspozycji na powierzchni [24]. Silne wiązanie enzymu z nośnikiem może jednak powodować obniżenie, a w skrajnym przypadku utratę, aktywności katalitycznej spowodowane blokowaniem dostępu substratu do centrum aktywnego [25]. Z tego powodu często stosuje się tzw. łącznik, którym może być aldehyd glutarowy (AG). Posiada on 2 grupy karbonylowe zdolne do utworzenia wiązań kowalencyjnych, a dodatkowo jest nietoksyczny, bakterio-, wiruso- i grzybobójczy [26].

Celem niniejszej pracy była immobilizacja stosowanej w przemyśle glukozylotransferazy cyklodekstrynowej (CGTazy) na syntetycznym nośniku polimerowym. Otrzymany biokatalizator CGTaza-AG-nośnik testowano w kilku cyklach reakcji otrzymywania cyklodekstryn, wyznaczono i porównano wydajności reakcji oraz stałe szybkości reakcji katalizowanych enzymem natywnym i biokatalizatorem otrzymanym w wyniku immobilizacji.

2. Materiały i metody

2.1. Enzym zastosowany do reakcji otrzymywania cyklodekstryn

Badaniom poddano enzym CGTazę z *Thermoanaerobacter* sp. (EC 2.4.1.19) w postaci roztworu o nazwie Toruzyme 3,0 L (Novozymes, Dania), który jest 4- α -D-(1,4- α -D-glukano)-transferazą 1,4- α -D-glukanu. W wyniku działania – Toruzyme 3,0 L α - i β -cyklodekstryny powstają w równych ilościach, ale przy dłuższym czasie reakcji dominującym składnikiem staje się β -cyklodekstryna. Optymalny zakres pH to 5,0-6,5, a temperatura nie powinna przekraczać 80-90°C.

2.2. Skrobia użyta do reakcji otrzymywania cyklodekstryn

Aktywność katalityczną biokatalizatora otrzymanego w wyniku immobilizacji CGTazy na nośniku testowano w reakcjach z użyciem skrobi ziemniaczanej (Sigma-Aldrich, Polska).

2.3. Nośnik polimerowy do immobilizacji CGTazy

Jako monomeru do otrzymania polimerowego nośnika użyto N-winyloformamidu, NVF (Sigma-Aldrich), który sieciowano diwinylobenzenem – DVB, dichlorowodorek 2,2'-azobis(2-metylopropionamidyny); Sigma-Aldrich, Polska.

Nośnik polimerowy p(NVF-co-DVB) otrzymano w wyniku syntezy metodą kopolimeryzacji rodnikowej w odwróconej suspensji [27]. Kopolimeryzację sieciującą N-winyloformamidu i diwinylobenzenu prowadzono w atmosferze obojętnej pod delikatnym strumieniem argonu. Kopolimeryzację sieciującą NVF z DVB realizowano w odwróconej suspensji w oleju metylosilikonowym. W okrągłodennej kolbie reakcyjnej o pojemności 250 cm³ zaopatrzonej w chłodnicę zwrotną, mieszadło mechaniczne, termometr i kapilarę do barbotowania argonem umieszczono 50 cm³ oleju silikonowego i ogrzewano do zadanej temperatury, barbotując argonem, po czym przy intensywnym mieszaniu wkraplano mieszaninę monomerów. Polimeryzację prowadzono w temperaturze 60°C w czasie 4 godzin. Ziarna usieciowanego polimeru zdekantowano, umieszczono w lejku Büchnera na sączku bibułowym i przemywano kilkakrotnie toluenem w celu odmycia oleju silikonowego [28].

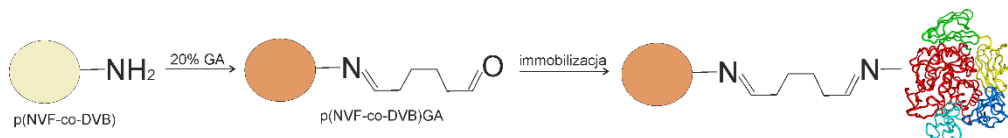
Otrzymano polimerowy nośnik z merami N-winyloformamidowymi, który aktywowano na powierzchni aldehydem glutarowym (GA) – Sigma-Aldrich, Polska – o stężeniu 20% [29]. W tym celu w kolbie okrągłodennej o objętości 100 cm³ umieszczono 30 cm³ przygotowanego wcześniej roztworu AG i wprowadzono nośnik. Całość ogrzewano w łaźni wodnej, ciągle mieszając. Reakcję prowadzono przez 4 godziny w temperaturze 50°C. Po zakończonej reakcji nośnik polimerowy odsączono na lejku Büchnera i przemyto buforem fosforanowym o pH 7,0. Nośnik wysuszono w suszarce próżniowej w temperaturze 40°C [30].

Oznaczenie symbolu nośnika p(NVF-co-DVB)GA: p(NVF – polimeryzacji poddano N-winyloformamid, co- z DVB – w reakcji kopolimeryzacji z DVB, GA – oznacza aktywację aldehydem glutarowym. Schemat aktywacji nośnika przedstawia rysunek 1.

2.4. Immobilizacja CGTazy na n ośniku polimerowym

Do 0,15 ± 0,01 g nośnika dodano 14,0 cm³ buforu fosforanowego o pH 7,0 oraz 1,0 cm³ enzymu i mieszano na mieszadle magnetycznym przez 150 minut. Następnie mieszaninę przesączono na lejku Büchnera przez sączek celulozowy o średnicy porów 0,2 μm (Whatman). W przesączu po immobilizacji oznaczono ilość enzymu.

Otrzymany biokatalizator przemywano po kolei roztworami buforowymi: fosforanowym o pH 7,0, fosforanowym pH 7,0 + 0,5 M NaCl, octanowym o pH 5,5 i TRIS-Cl pH 7,2. Otrzymany biokatalizator testowano w reakcjach otrzymywania cyklodekstryn ze skrobi ziemniaczanej.



Rysunek 1. Schemat aktywacji nośnika polimerowego p(NVF-co-DVB) aldehydem glutarowym oraz immobilizacji CGTazy na nośniku p(NVF-co-DVB)GA [opracowanie własne]

2.5. Reakcja otrzymywania cyklodekstryn

Skrobię zawieszoną w 50 mM buforze fosforanowym o pH 5,5 ogrzewano w temperaturze 90°C przez 10 minut. Otrzymano kleiki skrobiowe o stężeniu 0,1200 mg/cm³ ± 0,0001 mg/cm³, które następnie termostatowano w temperaturze 40°C i dodano: do jednego biokatalizator, do drugiego wolny enzym w ilości pozwalającej uzyskać aktywność 0,60 U/cm³ – w tym momencie rozpoczęto pomiar czasu reakcji. Próbkę inkubowano

przy łagodnym mieszaniu w temperaturze 40°C i w określonych odstępach czasu (20, 50 lub 100 minut), pobierano po 4,0 cm³ mieszaniny reakcyjnej. Reakcję prowadzono przez 7 godzin. Próbkę mieszaniny reakcyjnej ogrzewano we wrzącej łaźni wodnej przez 5 minut. Po zakończeniu reakcji enzymatycznej oznaczono stężenie α -, β - i γ -CD metodą HPLC.

Po każdym cyklu reakcji odzyskiwano enzym immobilizowany na nośniku i używano go w kolejnych cyklach z nowymi roztworami skrobi. Każdą reakcję otrzymywania cyklodekstryn wykonano 1 raz.

2.6. Sposób oznaczania α -, β - i γ -CD

Próbki mieszanin reakcyjnych filtrowano przez filtry membranowe z azotanu celulozy o średnicy porów 5 μ m (Whatman, Wielka Brytania) i analizowano metodą chromatografii HPLC. Zestaw zbudowany był z pompy Shimadzu LC 10A (Shimadzu, Tokio, Japonia), iniektora Rheodyne 1020 (Rheodyne, Palo Alto CA), kolumny Hypersil APS-2 (Thermoelectron Corp., Londyn, Wielka Brytania; 300 mm \times 4,5 mm) i detektora współczynnika załamania światła (L-7490 Merck, Darmstadt, Niemcy).

Jako fazę ruchomą zastosowano mieszaninę acetonitrylu oraz wody (80 : 20 obj.) z szybkością przepływu 0,5 cm³/min. Stężenia cyklodekstryn obliczono na podstawie krzywej kalibracyjnej przygotowanej przy użyciu standardów α -, β - i γ -CD (Sigma-Aldrich, Polska).

2.7. Oznaczanie zawartości białka metodą Lowry'ego

Ilość immobilizowanej na nośniku CGTazy wyznaczono na podstawie różnicy pomiędzy ilością enzymu w próbce do immobilizacji a ilością enzymu pozostającego w roztworze po immobilizacji [31], stosowano metodę Lowry'ego [32]. Pomiary wykonano na spektrofotometrze UV-Vis 2101PC Shimadzu, a ilość białka w badanych próbkach obliczono na podstawie krzywej kalibracyjnej tyrozyny (Sigma-Aldrich, Polska) w zakresie stężeń 5-100 μ g/cm³.

3. Wyniki

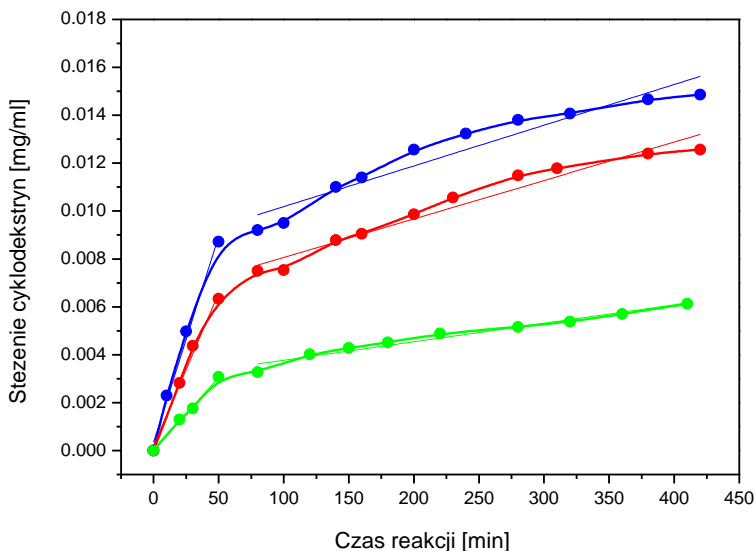
3.1. Ilość enzymu immobilizowanego na nośniku

Ilość enzymu immobilizowanego na nośniku określono jako procent unieruchomionego enzymu z próbki roztworu użytego do immobilizacji. Na nośniku polimerowym aktywowanym aldehydem glutarowym unieruchomieniu uległo 54% białka zastosowanego do immobilizacji. Odpowiadało to ilości wolnej CGTazy pozwalającej uzyskać aktywność w reakcji – wynoszącej 0,60 U/cm³.

3.2. Badania aktywności biokatalizatora CGTaza-AG-nośnik

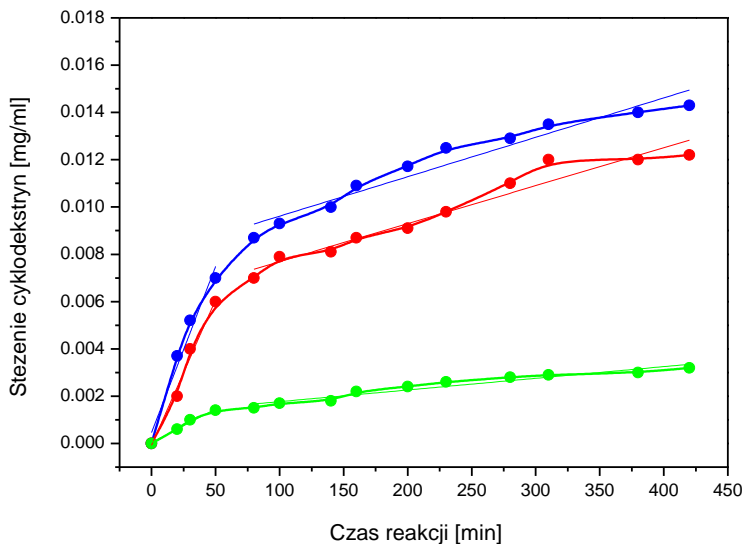
Przeprowadzono reakcję otrzymywania cyklodekstryn z zastosowaniem immobilizowanej CGTazy na nośniku polimerowym aktywowanym aldehydem glutarowym. Biokatalizator zastosowano w 3 cyklach reakcji.

Wykres 1 przedstawia zależność stężenia cyklodekstryn α , β i γ od czasu w I cyklu reakcji. Najwięcej otrzymano α -CD, mniej β -CD, zaś najmniej γ -CD.



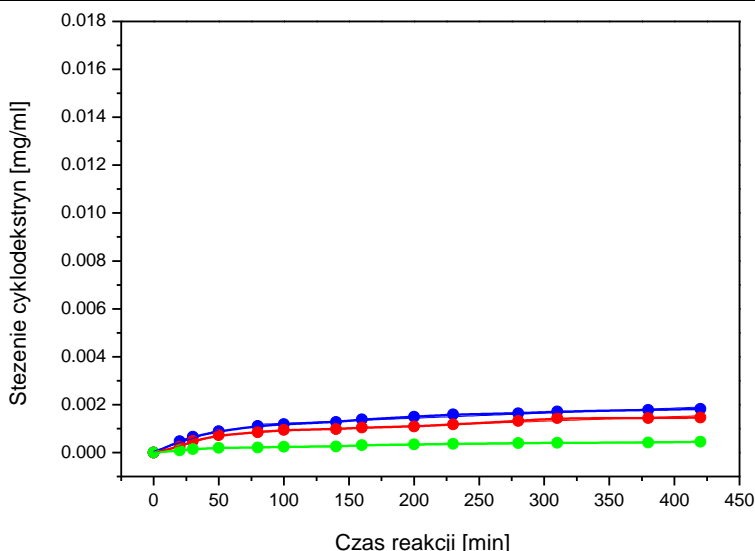
Wykres 1. Zależność stężenia cyklodekstryn od czasu reakcji: --- α-CD, --- β-CD, --- γ-CD; I cykl reakcji z zastosowaniem biokatalizatora [opracowanie własne]

Na wykresie 2 przedstawiono zależność stężenia cyklodekstryn α, β i γ od czasu reakcji. Jako katalizator zastosowano po raz 2. immobilizowany enzym, który już katalizował I cykl reakcji. Najwięcej otrzymano α-CD, mniej β-CD i najmniej γ-CD, ale z mniejszą wydajnością niż w I cyklu reakcji (tab. 1).



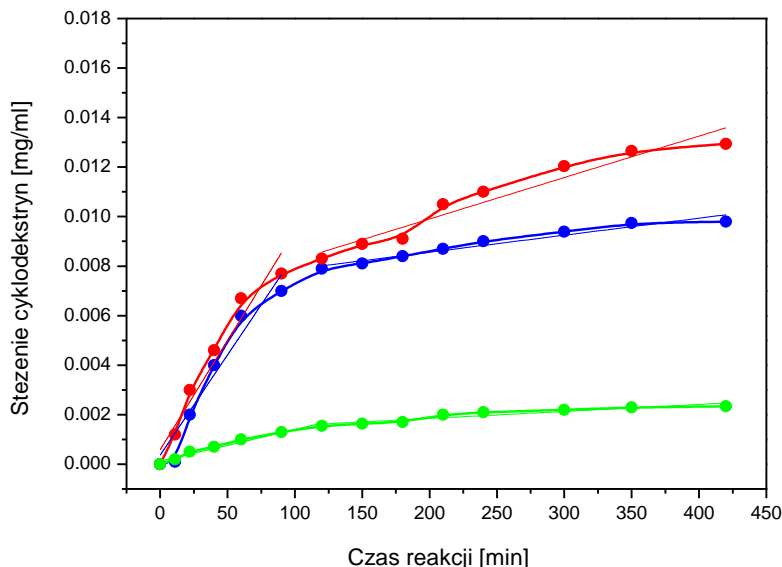
Wykres 2. Zależność stężenia cyklodekstryn od czasu reakcji: --- α-CD, --- β-CD, --- γ-CD; II cykl reakcji z zastosowaniem biokatalizatora [opracowanie własne]

Na wykresie 3 przedstawiono zależność stężenia cyklodekstryn α, β i γ od czasu reakcji. Jako katalizator reakcji użyto po raz 3. immobilizowanego enzymu, który już katalizował poprzednie 2 cykle. Nadal najwięcej otrzymano α-CD, mniej β-CD i najmniej γ-CD, ale z wydajnościami znacznie mniejszymi niż w I i II cyklu (tab. 1).



Wykres 3. Zależność stężenia cyklodekstryn od czasu reakcji: --- α-CD, --- β-CD, --- γ-CD; III cykl reakcji z zastosowaniem biokatalizatora [opracowanie własne]

W celu porównania wyników wykonano reakcję otrzymywania cyklodekstryn z zastosowaniem enzymu nieimmobilizowanego. Na wykresie 4 przedstawiono zależność stężenia cyklodekstryn od czasu reakcji – z użyciem CGTazy natywnej. Zgodnie z oczekiwaniami, otrzymano najwięcej β-CD, mniej α-CD i najmniej γ-CD.



Wykres 4. Zależność stężenia cyklodekstryn od czasu reakcji: --- α-CD, --- β-CD, --- γ-CD katalizowanej enzymem nieimmobilizowanym [opracowanie własne]

Zaobserwowano wzrost wydajności reakcji otrzymywania CD w wyniku zastosowania immobilizowanego enzymu. Wydajność ta była wyższa zarówno w I, jak i II cyklu reakcji. Mniejszą wydajność z użyciem biokatalizatora zanotowano dopiero w III cyklu reakcji.

reakcji. Ilość cyklodekstryn otrzymanych w poszczególnych reakcjach przedstawiono w tabeli 1.

Zastosowanie nieimmobilizowanego enzymu pozwoliło uzyskać 9,0 mg/ml α -CD, 11,4 mg/ml β -CD i 2,5 mg/ml γ -CD. Dzięki temu, że otrzymany biokatalizator został użyty w reakcji wielokrotnie i był on aktywny w 3 cyklach – sumaryczna ilość otrzymanych cyklodekstryn w cyklach I, II i III wynosiła: 31,0 mg/ml α -CD, 26,3 mg/ml β -CD i 11,1 mg/ml γ -CD, co stanowi o 244% więcej α -CD, o 130% β -CD i aż 344% więcej γ -CD.

Tabela 1. Wydajność reakcji otrzymywania cyklodekstryn z zastosowaniem enzymu natywnego i immobilizowanego na nośniku

CGTaza		Produkty	Wydajność reakcji $\times 10^{-3} [\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}]$	Stosunek otrzymanych CD $\alpha : \beta : \gamma$
immobilizowana	I cykl	α -CD	14,9	2,4 : 2 : 1
		β -CD	12,6	
		γ -CD	6,1	
	II cykl	α -CD	14,3	4,5 : 3,8 : 1
		β -CD	12,2	
		γ -CD	3,2	
	III cykl	α -CD	1,8	1 : 0,83 : 1
		β -CD	1,5	
		γ -CD	1,8	
nieimmobilizowana		α -CD	9,0	3,6 : 4,6 : 1
		β -CD	11,4	
		γ -CD	2,5	

Źródło: opracowanie własne.

Przebieg reakcji katalizowanej zarówno enzymem nieimmobilizowanym, jak i otrzymanym biokatalizatorem podzielono na etapy o liniowej zależności stężenia cyklodekstryn od czasu reakcji. Liniowa zależność sugeruje zerowy rząd reakcji hydrolizy z zastosowaniem katalizatora, tzn. że w tym przypadku szybkość reakcji nie zależy od stężenia skrobi, a jedynie od aktywności enzymu. Reakcje otrzymywania cyklodekstryn z zastosowaniem nieimmobilizowanej CGTazy oraz biokatalizatora enzym-nośnik przebiegały w 2 etapach. Dla każdego z etapów wyznaczono stałe szybkości reakcji (k), wartości przedstawiono w tabeli 2. W porównaniu z wolnym enzymem szybkość reakcji otrzymywania CD z zastosowaniem biokatalizatora jest większa w I i II cyklu, spada dopiero w III cyklu.

Tabela 2. Wartości stałych szybkości (k) wyznaczone dla reakcji otrzymywania cyklodekstryn z zastosowaniem enzymu natywnego i immobilizowanego na nośniku

CGTaza		Produkty	Stała szybkości reakcji $[\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}]$	
Immobilizowana	I cykl	α -CD	$k_I \times 10^{-4}$	$k_I \times 10^{-5}$
		α -CD	$1,7 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,2$
		β -CD	$1,28 \pm 0,09$	$1,6 \pm 0,1$
		γ -CD	$0,61 \pm 0,02$	$0,77 \pm 0,04$
	II cykl	α -CD	$1,4 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,1$
		β -CD	$1,2 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,1$
		γ -CD	$0,28 \pm 0,02$	$0,49 \pm 0,04$

	III cykl	α -CD	0,18 \pm 0,02	0,21 \pm 0,01
		β -CD	0,15 \pm 0,01	0,19 \pm 0,02
		γ -CD	0,040 \pm 0,003	0,069 \pm 0,006
nieimmobilizowana		α -CD	0,81 \pm 0,01	0,69 \pm 0,03
		β -CD	0,83 \pm 0,01	1,2 \pm 0,4
		γ -CD	0,13 \pm 0,01	0,28 \pm 0,02

Źródło: opracowanie własne.

4. Wnioski

1. Opracowano optymalne warunki reakcji umożliwiające immobilizację CGTazy na polimerowym nośniku, stosując aldehyd glutarowy (GA) jako łącznik pomiędzy polimerem a enzymem.
2. Otrzymano biokatalizator, który mógł być wielokrotnie użyty w reakcji otrzymywania cyklodekstryn. Biokatalizator wykazywał aktywność w 3 cyklach reakcji.
3. Uzyskano wyższą aktywność immobilizowanego enzymu w porównaniu do enzymu wolnego w 2 cyklach reakcji. W III cyklu biokatalizator nadal był aktywny, ale reakcja przebiegała z mniejszą wydajnością w porównaniu do reakcji enzymem nieimmobilizowanym.
4. Zaobserwowano zmianę stosunku otrzymywanych cyklodekstryn $\alpha : \beta : \gamma$. W reakcji z enzymem nieimmobilizowanym otrzymano najwięcej β -CD. Natomiast w reakcjach z biokatalizatorem w I i II cyklu najwięcej otrzymano α -CD. W III cyklu reakcji o najmniejszej wydajności otrzymano tyle samo α -CD i γ -CD.
5. Wykazano, że możliwość wielokrotnego zastosowania heterogenicznego biokatalizatora może znacznie zwiększyć ilość otrzymanych cyklodekstryn: o 244% więcej α -CD, o 130% β -CD i aż o 344% γ -CD.
6. Zaprezentowany biokatalizator CGTaza-AG-nośnik może być z sukcesem zastosowany w procesach technologicznych w celu obniżenia kosztów otrzymywania cyklodekstryn.

Literatura

1. Li Z., Wang M., Wang F., Gu Z., Du G., Wu J., Chen. J., *Gamma-cyclodextrin. A review on enzymatic production and applications*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 77(2), 2007, s. 245-255.
2. Zhang J., Li M., Zhang Y., *Enhancing the thermostability of recombinant cyclodextrin glucanotransferase via optimized stabilizer*, Process Biochemistry, 67, 2018, s. 64-70.
3. Alves-Prado H.F., Carneiro A.A., Pavezzi F.C., Gomes E., Boscolo M., Franco C.M., Da S.R., *Production of cyclodextrins by CGTase from Bacillus clausii using different starches as substrates*, Appl. Biochem. Biotechnol., 146(1-3), 2008, s. 3-13.
4. Farahat M., *Enhancement of β -cyclodextrin production and fabrication of edible antimicrobial films incorporated with clove essential oil/ β -cyclodextrin inclusion complex*, Microbiology and Biotechnology Letters, 48(1), 2020, s. 12-23.
5. Fiedorowicz M., Khachatryan G., Konieczna-Molenda A., Tomasik P., *Formation of cyclodextrins with cyclodextrin glucosyltransferase stimulated with polarized light*, Biotechnoogy Progress, 25(1), 2009, s. 147-150.
6. Duan M., Wang Y., Yang G., Li J., Wan Y., Deng Y., Mao Y., *High-level production of γ -cyclodextrin glycosyltransferase in recombinant Escherichia coli BL21 (DE3). Culture medium optimization, enzymatic properties characterization, and product specificity analysis*, Annals of Microbiology, 70(1), 2020.

7. Allegre M., Deratani A., *Cyclodextrin uses: from concept to industrial reality*, Agro-Food Industry Hi-Tech, 1994, s. 9-17.
8. Munro I.C., Newberne P.M., Young V.R., Bar A., *Safety assessment of gamma-cyclodextrin*, Regul Toxicol Pharmacol, 39(1), 2004, s. 3-13.
9. Challa R., Ahuja A., Ali J., Khar R.K., *Cyclodextrins in drug delivery: an updated review*, AAPS Pharm. Sci. Tech., 6(2), 2005, s. 329-357.
10. Hirano K., Ishihara T., Ogasawara S., Maeda H., Abe K., Nakajima T., Yamagata Y., *Molecular cloning and characterization of a novel γ -CGTase from alkalophilic Bacillus sp.*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 70(2), 2006, s. 193-201.
11. Takada M., Nakagawa Y., Yamamoto M., *Biochemical and genetic analyses of a novel gamma-cyclodextrin glucanotransferase from an alkalophilic Bacillus clarkii 7364*, J. Biochem., 133(3), 2003, s. 317-324.
12. Wang Z., Quan Y., Zhou F., *Optimization of medium composition for exopolysaccharide production by Phellinus nigricans*, Carbohydr. Polym., 105, 2014, s. 200-206.
13. Wang Y., Wan Y., Li J., Yang G., Deng Y., Wang J., *Expression and characterization of a recombinant γ -cyclodextrin glycosyltransferase from Bacillus clarkii 7364*, Chin. J. Bioprocess. Eng., 15(02), 2017, s. 7-12.
14. Long J., Zhao X., Liang F., Liu N., Sun Y., Xi Y., *Optimization of fermentation conditions for an Escherichia coli strain engineered using the response surface method to produce a novel therapeutic DNA vaccine for rheumatoid arthritis*, J. Biol. Eng., 12, 2018, s. 22.
15. Wu K., Ding L., Zhu P., Li S., He S., *Application of the response surface methodology to optimize the fermentation parameters for enhanced docosaheaxanoic acid (DHA) production by Thraustochytrium sp. ATCC 26185*, Molecules, 23(4), 2018, s. 974.
16. Basso A., Serban S., *Industrial applications of immobilized enzymes. A review*, Molecular Catalysis, 479(18), 2019, s. 110607.
17. Górecka E., Jastrzębska M., *Immobilization techniques and biopolimer carriers*, Biotechnology Food Sci., 75, 2011, s. 65-86.
18. Liease A., Hilterhaus L., *Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications*, Chem. Soc. Rev., 42, 2013, s. 6236-6249.
19. Wang B., Cheng F., Lu Y., Ge W., Zhang M., Yue B., *Chitosan activated with genipin. A nontoxic natural carrier for tannase immobilization and its application in enhancing biological activities of tea extract*, J. Mol. Catal. B. Enzym., 97, 2013, s. 137-143.
20. Sassolas A., Blum L.J., Leca-Bouvier B.D., *Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors*, Biotech. Adv., 30, 2012, s. 489-511.
21. Guisan J.M. (red.), *Methods in biotechnology. Immobilization of enzymes and cells*, Humana Press, Nowy Jork 2006, s. 185-198.
22. Ansari S.A., Husain Q., *Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials. A review*, Biotech. Adv., 30, 2012, s. 512-523.
23. Yushkova E.D., Nazarova E.A., Matyuhina A.V., Noskova A.O., Shavronskaya D.O., Vinogradov V.V., Skvortsova N.N., Krivoschapkina E.F., *Application of immobilized enzymes in food industry*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 67, 2019, s. 11553-11567.
24. Zdarta J., Meyer A.S., Jesionowski T., Pinelo M., *Developments in support materials for immobilization of oxidoreductases. A comprehensive review*, Advances in Colloid and Interface Science, 258, 2018, s. 1-20.
25. Zanon N.C.M., Oliveira O.N., Caseli L., *Immobilization of uricase enzyme in Langmuir and Langmuir-Blodgett films of fatty acids. Possible use as a uric acid sensor*, J. Colloid Interface Sci., 373, 2012, s. 69-74.
26. Lopez-Gallego F., *Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on animated supports*, J. Biotechnol., 119, 2005, s. 70-75.
27. Tąta A., Sokołowska K., Świder J., Konieczna-Molenda A., Proniewicz E., Witek E., *Study of cellulolytic enzyme immobilization on copolymers of N-vinylformamide*,

- Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 149, 2015, s. 494-504.
28. Konieczna-Molenda A., *Porównanie hydrolizy skrobi ziemniaczanej z zastosowaniem α -amylazy natywnej i immobilizowanej na nośnikach polimerowych*, [w:] Kalbarczyk K., Domina I. (red.), *Wybrane zagadnienia z zakresu mikrobiologii i innych nauk przyrodniczych*, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, Lublin 2022, s. 78-86.
 29. Witek E., *Crosslinking copolymerization of N-vinylformamide in inverse suspension*, Polymers, 53, 2008, s. 477-481.
 30. Konieczna-Molenda A., Kochanowski A., Walaszek A., Bortel E., Tomasik P., *Immobilization of α -mylase on poly(vinylamine) and poly(vinylformamide) supports and its performance*, Chem. Eng. J., 146, 2009, s. 5515-5519.
 31. Shen Y.X., Xiao K., Ling P., Ma Y.W., Huang X., *Improvement on the modified Lowry method against interference of divalent cations in soluble protein measurement*, Int. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Res., 97, 2013, s. 4167-4178.
 32. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*, Journal of Biological Chemistry, 193, 1951, s. 265-275.

Zastosowanie glukozylotransferazy cyklodekstrynowej (CGTazy) immobilizowanej na nośniku polimerowym do produkcji cyklodekstryn

Streszczenie

Unieruchomienie enzymu na nośniku może przynieść korzyści nie tylko dzięki możliwości obniżenia kosztów poprzez ponowne wykorzystanie lub zapewnienie ciągłości procesu, ale także poprzez zmianę specyficzności katalizatora względem produktów. W pracy zaprezentowano badania nad immobilizacją CGTazy na syntetycznym polimerowym nośniku aktywowanym aldehydem glutarowym. Immobilizowany enzym zastosowano kilkakrotnie w reakcji otrzymywania cyklodekstryn ze skrobi ziemniaczanej. Biokatalizator wykazywał aktywność katalityczną w 3 cyklach reakcji, a w 2 cyklach reakcja przebiegała z większą szybkością niż z zastosowaniem enzymu nieimmobilizowanego. Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że immobilizacja CGTazy na polimerowym nośniku to tani i prosty sposób uzyskania heterogenicznego biokatalizatora o korzystniejszych właściwościach niż enzym nieimmobilizowany.

Słowa kluczowe: CGTaza, cyklodekstryny, immobilizacja

The use of cyclodextrins glucosyltransferase (CGTase) immobilized on a polymer support for the production of cyclodextrins

Abstract

Immobilization of the enzyme on a support may have the benefit of not only being able to reduce costs by reusing or ensuring process continuity, but also by changing the specificity of the catalyst for the products. The paper presents research on the immobilization of CGTase on a synthetic, polymeric support activated with glutaraldehyde. The immobilized enzyme was used several times in the preparation of cyclodextrins from potato starch. The biocatalyst showed catalytic activity in three reaction cycles, and in two cycles the reaction was faster than with the use of the non-immobilized enzyme. Based on the obtained results, it can be concluded that the immobilization of CGTase on a polymer support is a cheap and simple way to obtain a heterogeneous biocatalyst with more favorable properties than the non-immobilized enzyme.

Keywords: CGTase, cyclodextrins, immobilization

Zmiany w zawartości glutationu i aktywności reduktazy glutationowej u grochu (*Pisum sativum* L.) w odpowiedzi na suplementację krzemem podczas stresu kadmowego

1. Wprowadzenie

Glutation to niskocząsteczkowy związek tiolowy, który w komórkach pełni rolę nieenzymatycznego przeciwutleniacza [1] chroniącego rośliny przed uszkodzeniami oksydacyjnymi [2, 3]. Częsteczka tego tripeptydu jest zbudowana z reszt kwasu glutaminowego, cysteiny i glicyny [1], przez co stanowi istotne miejsce przechowywania, a także transportu zredukowanej siarki [4]. Glutation występuje we wszystkich przedziałach komórkowych (takich jak cytozol, mitochondria, retikulum endoplazmatyczne, chloroplasty, wakuole, peroksosomy i apoplast), w formie związanej z innymi cząsteczkami oraz jako wolny glutation, który będąc w 2 odwracalnych stanach (glutation utleniony – GSSG i glutation zredukowany – GSH) bierze udział w utrzymaniu wewnątrzkomórkowej homeostazy redoks [5, 6]. Jedną z jego funkcji jest ochrona grup tiolowych białek przed negatywnym działaniem reaktywnych form tlenu (RFT), które nieodwracalnie inaktywują te białka [6]. Glutation uczestniczy także w procesie detoksykacji ksenobiotyków, w wyniku którego w cytozolu powstają S-koniugaty glutationu [7]. Reakcję koniugacji tych związków z glutationem katalizuje enzym S-transferaza glutationowa (GST), który – podobnie jak peroksydaza glutationowa (GSHPx) i reduktaza glutationowa (GR) – należy do enzymów GSH-zależnych [8].

Podczas stanu równowagi redoks w komórkach utrzymywany jest wysoki stosunek formy GSH do GSSG [9], w którym forma zredukowana stanowi od 90% do 98% jego całkowitej zawartości [10]. Stosunek ten ulega zmianie, gdy warunki środowiskowe stają się niekorzystne, co prowadzi do akumulacji GSSG [11]. Reakcja przekształcania dimeru dwusiarczkowego (GSSG) do zredukowanej formy sulfhydrylowej (GSH) zachodzi dzięki GR, która katalizuje zależną od NADPH konwersję GSSG do GSH (rys. 1) [12].

¹ aleksandra@orzol.pl, Katedra Chemii Środowiska i Bioanalitiky, Wydział Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, wydzial@chem.umk.pl.

² mszultka@umk.pl, Katedra Chemii Środowiska i Bioanalitiky, Wydział Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, wydzial@chem.umk.pl.

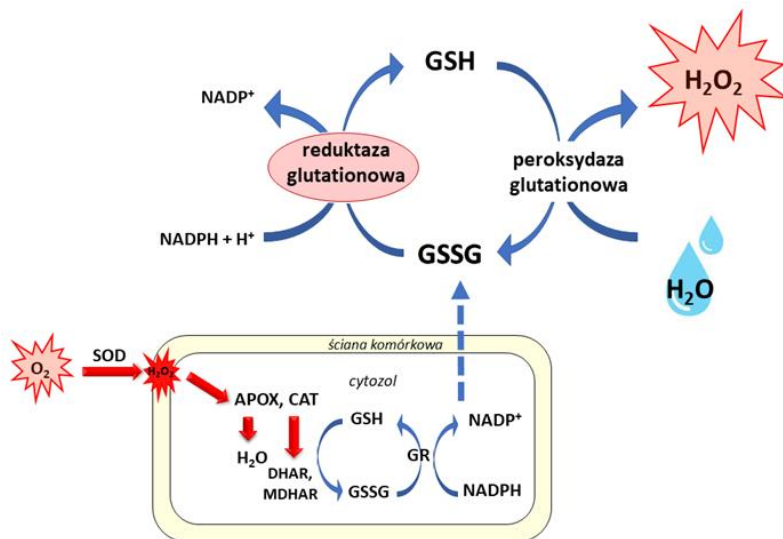
³ katarzyna.glowacka@uwm.edu.pl, Katedra Fizjologii, Genetyki i Biotechnologii Roślin, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, dziekbiol@uwm.edu.pl.

⁴ akrakowska@umk.pl, Interdyscyplinarne Centrum Nowoczesnych Technologii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, icnt@umk.pl.

⁵ michal.zloch@umk.pl, Interdyscyplinarne Centrum Nowoczesnych Technologii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, icnt@umk.pl.

⁶ bbusz@chem.umk.pl, Katedra Chemii Środowiska i Bioanalitiky, Wydział Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, wydzial@chem.umk.pl, Interdyscyplinarne Centrum Nowoczesnych Technologii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, icnt@umk.pl.

Przekształcenie GSSG do GSH w komórkach (z zachowaniem odpowiedniego stosunku pomiędzy formą zredukowaną a utlenioną) jest niezbędne do właściwego funkcjonowania roślin zarówno w warunkach optymalnych, jak i pod wpływem działania czynników abiotycznych [13]. GR jest oksydazą flawoproteinową (GR, E.C.1.6.4.2) [14], a konwersja GSSG do GSH jest kluczowym elementem cyklu askorbinianowo-glutationowego (AsA-GSH; cykl Halliwell-Asady) [15]. Głównym miejscem występowania GR w komórkach są chloroplasty, a w mniejszych ilościach GR jest obecna w mitochondriach i cytozolu [16]. Zawartość glutationu w roślinach jest różna i zależy od wielu czynników (między innymi od gatunku roślin i części morfologicznej). Analizując poziom zawartości glutationu w roślinach, autorzy wykazują jego wyższą zawartość w liściach niż w korzeniach, a jego poziom ulega zmianie wraz ze wzrostem i rozwojem roślin [17, 18]. Aktywność GR w roślinach jest związana z poziomem GSH w komórkach, którego ilość pod wpływem zwiększonej aktywności GR również wzrasta. Zależność tych 2 parametrów wpływa zatem na tolerancję roślin na stres, na co wskazują L. Yin i in. (2017). Autorzy wykazali powiązanie nadekspresji GR i wysokiego poziomu GSH (a także stosunku GSH : GSSG) z usuwaniem RFT oraz reaktywnych pochodnych karbonylowych (RCS, ang. *reactive carbonyl species*) z komórek roślin poddanych stresowi glinowemu (Al) [19].



Rysunek 1. Reakcja redukcji dwusiarczku glutationu do zredukowanej formy katalizowana przez reduktazę glutationową (APOX – peroksydaza askorbinianowa; CAT – katalaza; DHAR – reduktaza dehydroaskorbinianowa; GR – reduktaza glutationowa; GSH – glutation zredukowany; GSSG – glutation utleniony; MDHAR – reduktaza monodehydroaskorbinianowa; NADP⁺ – fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego; NADPH – fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego, postać zredukowana; SOD – dysmutaza ponadtlenkowa); opracowanie własne na podstawie [20]

Wytwarzane w komórkach RFT są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania wszystkich żywych organizmów. Generowanie RFT zachodzi zarówno w optymalnych warunkach środowiskowych, jak i pod wpływem czynników stresowych [15]. RFT uczestniczą w regulacji ważnych procesów związanych z cyklem komórkowym, a także podziałem komórek, wzrostem i rozwojem roślin oraz starzeniem się i śmiercią komórek [21]. Obecność RFT w przedziałach komórkowych sprzyja aklimatyzacji roślin do nie-

korzystnych warunków środowiskowych. Produkowane są między innymi w apoplazmie (głównie przez oksydazy NADPH, peroksydazy i niektóre oksydazy), a wykorzystywane jako cząsteczki sygnałowe wpływające na ekspresję genów i zwiększające odporność roślin na stres [22]. Jednak RFT mogą również powodować bezpośrednie oksydacyjne uszkodzenia kwasów nukleinowych, białek i lipidów ze względu na brak równowagi pomiędzy wytwarzaniem RFT i ich wygaszaniem, co prowadzi do wystąpienia w komórkach szoku tlenowego [23].

Zanieczyszczenie gruntów uprawnych metalami ciężkimi stanowi poważne zagrożenie środowiskowe dla roślin. Kadm (Cd) jest silnie toksycznym metalem ciężkim, który jest łatwo przyswajany przez rośliny [24]. Rośliny pobierają Cd z roztworu glebowego i przenoszą go z korzeni do pędów za pośrednictwem transporterów Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} i Zn^{2+} [25]. Wysoka fitotoksyczność Cd wynika między innymi z zaburzenia równowagi gospodarki mineralnej roślin poprzez zakłócenie procesu pobierania, transportu i przyswajania składników odżywczych z roztworu glebowego. Pobrany przez rośliny Cd zaburza szereg procesów fizjologicznych i biochemicznych. Jego działanie powoduje nadprodukcję RFT i peroksydację lipidów, zmiany w ultrastrukturze chloroplastów, chlorozę i epinastię liści oraz zahamowanie wzrostu i rozwoju roślin [26].

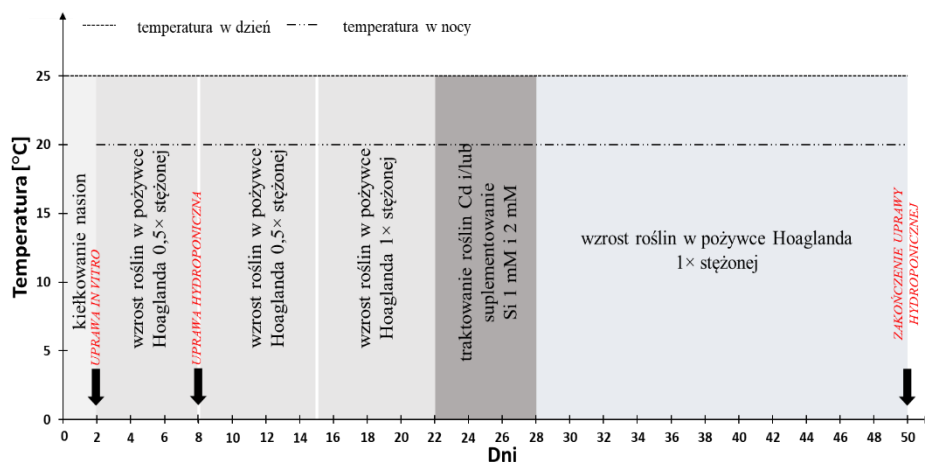
W łagodzeniu toksycznego działania Cd w roślinach wykorzystywany jest krzem (Si). Pierwiastek ten jest uważany za nieistotny (lub quasi-niezbędny) dla wzrostu i rozwoju roślin [27]. Krzem występuje w glebie głównie w postaci stałych ugrupowań krystalicznych, które – podobnie jak nierozpuszczalne w wodzie krzemionka i krzemiany – są niedostępne dla roślin. Jedyną przyswajalną przez rośliny formą Si jest kwas ortokrzemowy (H_4SiO_4), który po rozpuszczeniu w roztworze glebowym staje się niestabilną cząsteczką. Występuje on w glebach w postaci monomeru (H_4SiO_4^* , gleba o pH 2-9) lub w postaci zjonizowanej (H_3SiO_4^- i $\text{H}_2\text{SiO}_4^{2-}$, gleba o wartości pH > 9) [28]. Zdolność roślin do akumulowania Si w tkankach jest zróżnicowana pomiędzy gatunkami i wynika z odmiennego systemu jego pobierania i transportu. Po pobraniu Si przez korzenie jest on transportowany przez ksylem do pędu [29]. Krzem może pełnić w roślinach rolę modulatora poprzez aktywowanie w nich reakcji obronnych oraz oddziaływanie na elementy systemu sygnalizacji stresu, co prowadzi do indukowania odporności [30]. W literaturze opisano pozytywny wpływ Si na gospodarkę makro- i mikroskładników w roślinach poddanych stresowi Cd [31]. Udowodniono także, że Si ogranicza pobieranie Cd przez korzenie oraz hamuje jego transport z korzeni do pędów [32, 33]. Adaptacja roślin do zanieczyszczających środowisko metali ciężkich obejmuje powiązane ze sobą mechanizmy fizjologiczne i molekularne. Przykładem wewnątrzkomórkowych mechanizmów jest kompleksowanie jonów metali ciężkich między innymi przez fitochelatyny (PC, ang. *phytochelatins*). PC są syntetyzowane z glutationu, a funkcjonalnie są analogami metalotionein zwierzęcych (MT, ang. *metallothioneins*). Pobrany przez rośliny Cd jest związany przez PC poprzez tworzenie z nimi kompleksów Cd-PC. Powstałe kompleksy są transportowane z cytozolu do wakuoli lub na zewnątrz komórek przez wiążące ATP kasetowe transportery [33, 34].

Udowodniono wysoką fitotoksyczność Cd w roślinach oraz jego wpływ na szereg procesów fizjologicznych i biochemicznych [35, 36]. Wiadomo również, że ekspozycja roślin na Cd powoduje w nich indukcję stresu oksydacyjnego [37]. Dlatego celem niniejszej pracy było zbadanie aktywności GR w procesach detoksykacyjnych zależnych od glutationu, w roślinach suplementowanych Si i poddanych stresowi Cd.

2. Materiał i metody

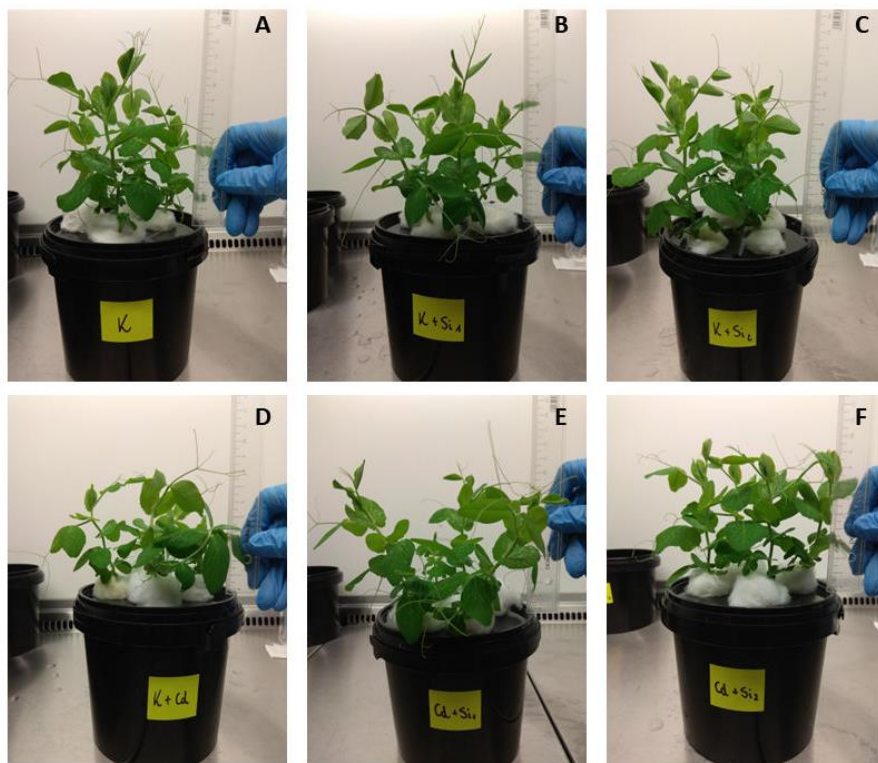
2.1. Plan eksperymentu

Nasiona grochu zwyczajnego (*Pisum sativum* L., odmiana Pegaz) kiełkowano w ciemności w temperaturze 25°C przez 48 godzin (inkubator NÜVE ES 120). Przed kiełkowaniem nasiona dezynfekowano 70% izopropanolem przez 1 minutę i 2% podchlorynem sodu przez 15 minut. Proces dezynfekcji zakończono poprzez 5-krotne płukanie nasion demineralizowaną i sterylną wodą. Odkazane nasiona przeniesiono do sterylnych, szklanych pojemników z 20 ml 0,5× stężonej pożywce Hoaglanda o pH = 6 (rys. 2).



Rysunek 2. Schemat eksperymentu [opracowanie własne]

Po 6 dniach młode siewki grochu przeniesiono do 1-litrowych plastikowych pojemników ($\varphi = 12$ cm, 4 rośliny na pojemnik). Warunki wzrostu: 7 dni w 0,5× stężonej pożywce Hoaglanda i kolejne 7 dni w 1× stężonym roztworze Hoaglanda. Po 21 dniach rośliny suplementowano 1 mM Na_2SiO_3 lub 2 mM Na_2SiO_3 (Si) i/lub traktowano 50 μM CdSO_4 (Cd) poprzez dodanie związków do pożywki. Rośliny kontrolne uprawiano w pożywce Hoaglanda o pH = 6 bez dodatku Cd i Si. Uprawę hydroponiczną prowadzono przez kolejne 3 tygodnie w 1× stężonym roztworze Hoaglanda o wartości pH = 6. Podczas prowadzenia uprawy hydroponicznej roztwór pożywki wymieniano co 2-3 dni (rys. 3). Kiełkowanie, wzrost i rozwój roślin kontrolowano poprzez zastosowanie w trakcie doświadczenia komory inkubacyjnej (Snijders Scientific™ Plant Growth Cabinet), dla której ustalono następujące warunki: wilgotność względna 70%, fotoperiod 10 godzin / 14 godzin oraz temperatura 25°C / 20°C odpowiednio w dzień i w nocy. Po zakończeniu uprawy hydroponicznej (po 21 dniach od traktowania/suplementowania) z pędów usunięto kwiaty i strąki, następnie rośliny podzielono na pędy i korzenie oraz zamrożono w ciekłym azocie. Materiał roślinny był przechowywany do czasu wykonania analiz w temperaturze -80°C. Przed przystąpieniem do wykonywania analiz biochemicznych tkanki roztarto w ciekłym azocie i rozważono po 200 mg (1 powtórzenie). Analizy wykonano w 4 powtórzeniach, gdzie 1 powtórzenie stanowiło materiał z 4 pędów lub z 4 korzeni rosnących w 1 pojemniku. Dodatkowo po zakończeniu uprawy hydroponicznej część roślin przeznaczono do analiz biometrycznych, określając suchą masę, całkowitą zawartość wody oraz względne wydłużenie korzeni i pędów.



Rysunek 3. Zdjęcia roślin podczas wymiany pożywki (A – rośliny kontrolne, B – rośliny suplementowane 1 mM Na_2SiO_3 , C – rośliny suplementowane 2 mM Na_2SiO_3 , D – rośliny traktowane 50 μM CdSO_4 , E – rośliny traktowane 50 μM CdSO_4 i suplementowane 1 mM Na_2SiO_3 , F – rośliny traktowane 50 μM CdSO_4 i suplementowane 2 mM Na_2SiO_3) [opracowanie własne]

2.2. Pomiary biometryczne

Po zakończeniu uprawy hydroponicznej przeprowadzono analizę suchej masy pędów i korzeni wraz z określeniem w nich całkowitej zawartości wody, a także zbadano względne wydłużenie analizowanych części roślin.

Rośliny wyjęto z pojemników, dokładnie osuszone i sfotografowano. Następnie podzielono na pędy i korzenie ($n = 5$), po czym zważono ich świeżą masę (g) i zapakowano w specjalnie przygotowane saszetki, które umieszczono w suszarce z wymuszonym obiegiem powietrza (suszarka laboratoryjna SLN 53, POL-EKO). Badane części roślin suszono przez 24 godziny w 90°C w celu określenia suchej masy części wegetatywnych roślin. Po wysuszeniu pędów i korzeni ponownie je zważono, uzyskując ich suchą masę (g). Na podstawie uzyskanych danych (świeża i sucha masa) obliczono całkowitą zawartość wody [38] w pędach i korzeniach zgodnie ze wzorem:

$$\text{całkowita zawartość wody} = \frac{\text{świeża masa} - \text{sucha masa}}{\text{sucha masa}} \quad (1)$$

Długość pędów i korzeni ($n = 8$) zmierzono na podstawie wykonanych zdjęć, wykorzystując program ImageJ (wersja 1.53k) [39]. Na podstawie uzyskanych danych obliczono względne wydłużenie pędów i korzeni [40] zgodnie ze wzorami:

$$\text{względne wydłużenie pędów} = \frac{\text{dł. pędów Cd i/lub dł. pędów Si}}{\text{dł. pędów kontrolnych}} \times 100\% \quad (2)$$

gdzie: dł. pędów Cd i/lub dł. pędów Si – długość pędów roślin traktowanych 50 μM CdSO_4 i/lub suplementowanych 1 mM Na_2SiO_3 i 2 mM Na_2SiO_3 , dł. pędów kontrolnych – długość pędów kontrolnych;

$$\text{względne wydłużenie korzeni} = \frac{\text{dł. korzeni Cd i/lub dł. korzeni Si}}{\text{dł. korzeni kontrolnych}} \times 100\% \quad (3)$$

gdzie: dł. korzeni Cd i/lub dł. korzeni Si – długość korzeni roślin traktowanych 50 μM CdSO_4 i/lub suplementowanych 1 mM Na_2SiO_3 i 2 mM Na_2SiO_3 , pędów kontrolnych – długość korzeni roślin kontrolnych.

2.3. Analizy biochemiczne

Z zabezpieczonego w temperaturze -80°C materiału roślinnego (części morfologiczne – pędy i korzenie) przygotowano ekstrakty, które następnie analizowano metodami spektrofotometrycznymi (spektrofotometr Infinite® 200 PRO NanoQuant, Tecan). Zamrożone tkanki (po 200 mg na 1 powtórzenie) homogenizowano na lodzie w 2 ml mieszaniny 6% kwasu metafosforowego i 1 mM kwasu wersenowego. Uzyskany homogenat wirowano przez 15 minut w temperaturze 4°C przy obrotach $11\,500 \times \text{g}$. [41].

2.3.1. Zawartość GSH i GSSG

Zawartość całkowitego glutationu, GSH oraz GSSG oznaczono zgodnie z metodą S. Sahoo i in. (2018) [41]. Do analizy zawartości całkowitego glutationu pobrano 400 μl wcześniej przygotowanego supernatantu, do którego dodano 1 ml 0,5 M buforu potasowo-fosforanowego ($\text{pH} = 7,5$), 100 μl 10 mM DTNB (kwas 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoesowy), 200 μl 10 mM BSA (surowicza albumina wołowa) oraz 100 μl 0,5 mM NADH (dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy). Następnie próby dokładnie wymieszano i inkubowano w 37°C przez 15 minut (termoblok, ThermoStat plus, Eppendorf). Po tym czasie próby doprowadzono do temperatury pokojowej, po czym zmierzono absorbancję przy długości fali $\lambda = 412 \text{ nm}$.

Przed oznaczeniem zawartości GSSG usuwano z supernatantu GSH poprzez dodanie do ekstraktu 2-winylopirydyny i inkubację prób przez 1 godzinę w temperaturze 25°C . Następnie do 100 μl ekstraktu dodano 600 μl buforu reakcyjnego zawierającego 100 mM bufor potasowo-fosforanowy ($\text{pH} = 7,5$) i 5 mM kwas wersenowy. Po dokładnym wymieszaniu prób dodano kolejno 100 μl drożdżowej reduktazy glutationowej (rozcieńczenie 20 U/ml) oraz 100 μl 10 mM DTNB. Do zapoczątkowania reakcji zastosowano 2,5 mM NADPH (fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego – postać zredukowana). Absorbancję mierzono przy długości fali $\lambda = 412 \text{ nm}$. Zawartość glutationu wyrażono w $\mu\text{g} \times \text{mg}^{-1}$ suchej masy.

Zawartość GSH uzyskano po odjęciu GSSG od uzyskanych wartości całkowitego glutationu. Do obliczenia zawartości GSH i GSSG zastosowano także krzywe standardowe dla obu form glutationu.

2.3.2. Aktywność GR

Aktywność GR mierzono według metody J. Zhang i in. (1996), wprowadzając pewne modyfikacje [42]. Do określenia aktywności enzymu wykorzystano bufor reakcyjny o temperaturze 24°C , który zawierał 0,5 M bufor sodowo-fosforanowy ($\text{pH} = 7,8$), 1 mM kwas wersenowy i 1 mM GSSG. Do zapoczątkowania reakcji zastosowano 0,2 mM NADPH. Absorbancję mierzono przy użyciu spektrofotometru (Tecan Infinite 200 PRO)

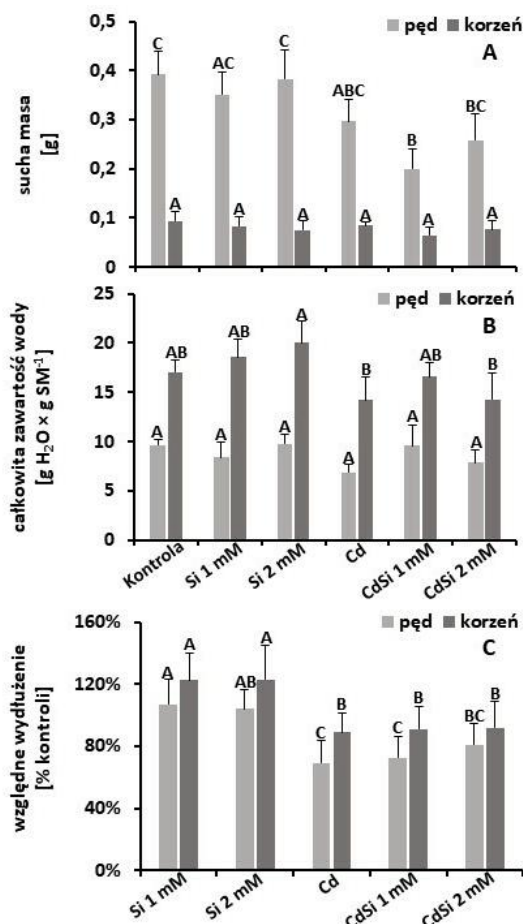
przy długości fali 340 nm. Jedna jednostka [$U \times mg^{-1}$ białka] aktywności GR została wyrażona jako zmiana absorbancji na minutę $\times mg^{-1}$ suchej masy. Zawartość białka w próbach oznaczono metodą Bradforda (1976) [43].

2.4. Analiza statystyczna

Przeprowadzono dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA) w celu zbadania istotności wpływu Si i Cd oraz interakcji pomiędzy Si i Cd w analizowanych parametrach. Do analizy *post hoc* wykorzystano test Tukeya przy poziomie istotności $p < 0,01$. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programu STATISTICA (wersja 13.1 Dell Inc., Tulsa, OK, USA).

3. Wyniki i dyskusja

Rośliny grochu zwyczajnego traktowanego $50 \mu M$ Cd i/lub suplementowanego 1 mM lub 2 mM Si wykorzystano do analizy suchej masy, całkowitej zawartości wody oraz względnego wydłużenia pędów i korzeni (rys. 4).



Rysunek 4. Sucha masa (A), całkowita zawartość wody (B) oraz względne wydłużenie (C) pędów i korzeni grochu zwyczajnego (*Pisum sativum* L.) traktowanego $50 \mu M$ CdSO₄ i/lub suplementowanego 1 i 2 mM Na₂SiO₃. Wartości są wyrażone jako średnia \pm SD. Różne litery reprezentują istotne różnice ($p < 0,01$) w odniesieniu do średnich w zakresie analizowanych parametrów w danym organie [opracowanie własne]

W wyniku przeprowadzonych analiz określono, iż zastosowanie Cd w uprawie hydroponicznej grochu miało istotny wpływ na suchą masę, całkowitą zawartość wody oraz względne wydłużenie analizowanych pędów i korzeni. Po dodaniu do pożywki 50 μM roztworu Cd stwierdzono istotne zmniejszenie suchej masy w korzeniach i pędach (0,0845 g i 0,297 g) w porównaniu z suchą masą korzeni i pędów roślin kontrolnych (0,0944 g i 0,3926 g). Ponadto zastosowanie jednocześnie z Cd suplementacji Si (1 mM i 2 mM) spowodowało istotne statystycznie obniżenie zawartości suchej masy w badanych korzeniach i pędach w porównaniu z analizowanymi częściami roślin kontrolnych i traktowanych Cd. W korzeniach roślin suplementowanych 2 mM Si zanotowano istotny wzrost całkowitej zawartości wody w porównaniu z korzeniami roślin kontrolnych (odpowiednio 20,06 g $\text{H}_2\text{O} \times \text{g SM}^{-1}$ i 17,08 g $\text{H}_2\text{O} \times \text{g SM}^{-1}$), natomiast sucha masa korzeni roślin suplementowanych 2 mM Si była istotnie niższa w porównaniu z korzeniami roślin kontrolnych. Podobna zależność występowała w roślinach traktowanych Cd, w których całkowita zawartość wody w pędach i korzeniach była niższa od zawartości wody w roślinach traktowanych Cd i suplementowanych Si 1 mM. Wpływ suplementacji roślin Si był widoczny w analizie względnego wydłużenia pędów i korzeni. Rośliny suplementowane 1 mM roztworem Si miały istotnie dłuższe pędy i korzenie w porównaniu z badanymi częściami roślin kontrolnych. W przypadku suplementacji roślin 2 mM roztworem Si analiza wykazała istotne statystycznie względne wydłużenie analizowanych pędów i korzeni w porównaniu do analizowanych części roślin kontrolnych. Ponadto zastosowanie 1 mM roztworu Si z jednoczesnym traktowaniem roślin Cd spowodowało wzrost względnego wydłużenia pędów w stosunku do pędów roślin traktowanych Cd. Negatywny wpływ Cd na rośliny w aspekcie ich wzrostu i rozwoju został wielokrotnie udowodniony. W zależności od zastosowanego stężenia Cd oraz czasu ekspozycji – wykazano jego toksyczny wpływ na wzrost roślin, powierzchnię liści, świeżą i suchą masę, a jego negatywne skutki oddziaływania na rośliny następowały w różnym stopniu [44, 45]. K. Bavi i in. (2011) wykazali, iż traktowanie roślin niskimi stężeniami Cd (5-10 $\mu\text{M CdCl}_2$) nieznacznie zmniejsza zawartości suchej masy korzeni. Zwiększenie jego stężenia do 50 μM zmniejsza zawartość suchej masy korzeni ciecierzycy o 50% w porównaniu z korzeniami roślin kontrolnych [46]. Zastosowanie w niniejszej pracy takiego samego stężenia Cd również spowodowało obniżenie zawartości suchej masy korzeni, natomiast dużo niższa zawartość suchej masy została przez nas wykazana w pędach grochu (obniżenie suchej masy o 35% w porównaniu z pędami roślin kontrolnych). Analiza morfologicznych części roślin wystawionych na bezpośrednie działanie Cd daje miarodajne dane dotyczące jego toksyczności. Podobną tendencję obniżenia zawartości suchej masy stwierdzono również dla pędów rakiety siewnej (*Eruca sativa* Mill.) traktowanej Cd, chociaż rośliny te były poddane działaniu wyższych stężeń Cd niż stężenie zastosowane w naszym doświadczeniu (100, 150 i 200 $\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$). Traktowanie rakiety siewnej Cd spowodowało, podobnie jak w naszych badaniach, istotne obniżenie względnej zawartości wody w porównaniu z roślinami kontrolnymi [47]. Względne wydłużenie korzeni i pędów, jak również ich długość, jest bezpośrednio skorelowane z wpływem metali ciężkich na rośliny, co potwierdzono analizą długości pędów i korzeni roślin. Podobne wyniki uzyskali A. Krantev i in. (2008), którzy stwierdzili, że zastosowanie Cd w uprawie roślin zmniejsza długość korzeni i pędów. Dodatkowo wskazali, iż Cd ma negatywny wpływ na rozwój korzeni bocznych badanych roślin, natomiast zastosowanie w uprawie hydroponicznej grochu zwyczajnego suplementacji Si potwierdziło jego pozytywne działanie na rozwój roślin, w tym na długość ich korzeni

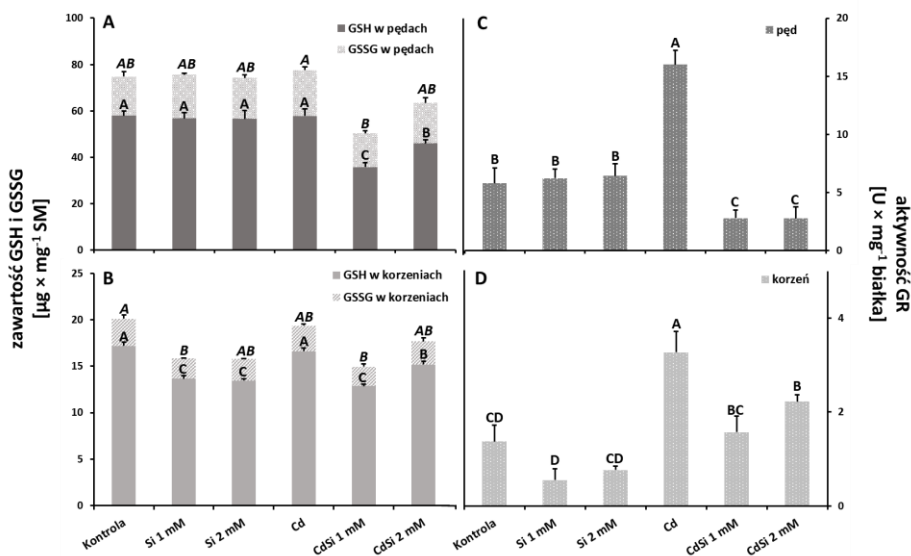
i pędów [48]. Podobną tendencję wykazali w swoich badaniach S.A.F. El-Okkiah i in. (2022), przeprowadzając analizę wysokości roślin grochu zwyczajnego po dolistnym zastosowaniu Si. W wyniku przeprowadzonych analiz udowodnili stymulujący wpływ Si na wzrost badanych roślin, które były wyższe od roślin kontrolnych 7-9%, w zależności od zastosowanego stężenia Si [49]. Przedstawione przez nas badania nad stymulującym wzrost roślin działaniem Si z jednoczesnym traktowaniem ich Cd przyniosły podobne rezultaty jak w eksperymencie prowadzonym przez S.A.F. El-Okkiah i in. (2022). Wykazano w nim, iż przy jednoczesnym zastosowaniu w uprawie roślin Si i Cd dochodzi do łagodzenia toksycznego działania Cd, czego dowodem było uzyskanie przez badaczy dłuższych roślin jednocześnie suplementowanych i traktowanych w porównaniu z roślinami wyłącznie traktowanymi Cd [49]. M. Rostamie i in. (2019) również stwierdzili łagodzący wpływ suplementacji roślin Si przy ich jednoczesnym traktowaniu Cd. Wykazali, że sucha masa roślin traktowanych Cd i suplementowanych Si była wyższa w porównaniu z suchą masą roślin wyłącznie traktowanych Cd. Ponadto udowodnili pozytywne działanie suplementacji Si w uprawie *Lallemantia royleana*, której sucha masa była wyższa w porównaniu do suchej masy roślin kontrolnych. Badany parametr był mierzony w odniesieniu do całej rośliny, nie wskazując przy tym, w jaki sposób sucha masa różni się w poszczególnych częściach roślin [50]. W prezentowanych w niniejszej pracy badaniach sucha masa roślin jednocześnie traktowanych Cd i suplementowanych Si nie wykazała łagodzącego działania Si. Brak wykazania przez nas w tym parametrze pozytywnego działania Si przy jednoczesnym traktowaniu roślin Cd może wynikać z różnic w przeprowadzonych eksperymentach (warunki uprawy roślin, pH, długość trwania eksperymentu), nie wyklucza przy tym pozytywnego działania Si w roślinach traktowanych Cd.

Pędy i korzenie grochu zwyczajnego traktowanego 50 μM Cd i/lub suplementowanego 1 mM lub 2 mM Si wykorzystano również do oznaczenia zawartości GSH i GSSG oraz aktywności GR. Po 21 dniach od traktowania i/lub suplementowania roślin określono we wszystkich wariantach wyższą zawartość glutationu (GSH i GSSG) w pędach w porównaniu z badanymi korzeniami (rys. 5A i 5B). Istotnie niższą zawartość GSH i GSSG oznaczono w pędach grochu traktowanego Cd i suplementowanego 1 mM Si w porównaniu z analizowanymi częściami pozostałych roślin. Zawartość glutationu w tych pędach była istotnie niższa (GSH – 38% i GSSG – 26%) w porównaniu z zawartością w pędach roślin traktowanych tylko Cd. W pędach grochu traktowanego Cd i suplementowanego 2 mM Si również zaobserwowano istotne zmniejszenie zawartości GSH i GSSG w porównaniu z pędami i korzeniami roślin kontrolnych. W pozostałych analizowanych pędach zawartość glutationu była porównywalna z jego zawartością w roślinach kontrolnych. W pędach roślin traktowanych Cd i suplementowanych 1 mM Si stosunek GSH do GSSG wynosił 2 : 1. W pozostałych pędach stosunek ten nie był zróżnicowany i wynosił 3 : 1 (tab. 1).

Tabela 1. Stosunek zawartości GSH do GSSG w pędach i korzeniach grochu zwyczajnego (*Pisum sativum* L.) traktowanego 50 μM CdSO_4 i/lub suplementowanego 1 mM Na_2SiO_3 i 2 mM Na_2SiO_3

	Kontrola	Si 1 mM	Si 2 mM	Cd	CdSi 1 mM	CdSi 2 mM
GSH : GSSG pęd	3 : 1	3 : 1	3 : 1	3 : 1	2 : 1	3 : 1
GSH : GSSG korzeń	6 : 1	6 : 1	6 : 1	6 : 1	6 : 1	6 : 1

Źródło: opracowanie własne.



Rysunek 5. Zawartość GSH i GSSG oraz aktywność GR w pędach (A, C) i korzeniach (B, D) grochu zwyczajnego (*Pisum sativum* L.) traktowanego $50 \mu\text{M}$ CdSO_4 i/lub suplementowanego 1 mM Na_2SiO_3 i 2 mM Na_2SiO_3 . Jedna jednostka aktywności [$\text{U} \times \text{mg}^{-1}$ białka] to zmiana absorbancji na minutę $\times \text{mg}^{-1}$ suchej masy. Wartości są wyrażone jako średnia z 4 powtórzeń $\pm \text{SD}$. Różne litery reprezentują istotne różnice ($p < 0,01$) w odniesieniu do średnich w zakresie analizowanych parametrów w danym organie [opracowanie własne]

Zawartość glutationu w korzeniach roślin suplementowanych Si była istotnie niższa w porównaniu z poziomem glutationu w korzeniach roślin kontrolnych. Zmniejszoną zawartość GSH i GSSG obserwowano w korzeniach roślin traktowanych Cd i suplementowanych Si. Dodanie do pożywki Cd i 1 mM Si spowodowało istotne statystycznie zmniejszenie ilości GSH i GSSG w porównaniu z zawartością glutationu w korzeniach roślin traktowanych Cd. Podobną zależność spadku glutationu oznaczono w korzeniach roślin traktowanych Cd i suplementowanych 2 mM Si. Stosunek ilości GSH do GSSG w analizowanych korzeniach nie był zróżnicowany i wynosił $6 : 1$ (tab. 1).

Jedną z metod detoksykacji roślin poddanych stresowi kadmowemu jest ograniczenie pobierania Cd z roztworu glebowego. W wielu badaniach udowodniono łagodzącą rolę Si w roślinach narażonych na działanie Cd [51]. Wykazano także udział Si w detoksykacji, translokacji i dystrybucji metali ciężkich w roślinach, co w efekcie umożliwia im przetrwanie w niekorzystnych warunkach środowiska. W ograniczeniu fitotoksycznego działania Cd uczestniczą również PC, które wiążą jony metali ciężkich oraz modulują odpowiedź i tolerancję roślin na działanie stresu kadmowego [52]. Prekursorem PC jest glutation, który tak samo jak PC może pełnić rolę nośnika Cd w roślinach [53]. W badaniach skupiono się nad zmianą zawartości glutationu w pędach i korzeniach roślin traktowanych Cd i suplementowanych Si. Uznaje się, że stosowanie w uprawach roślin suplementacji Si wzmacnia działanie przeciwutleniaczy, które w warunkach stresu skutecznie wyłapują RFT [54]. Pozytywny wpływ suplementacji Si roślin udowodnili P. Alam i in. (2021), wykazując jego rolę w regulacji cyklu Asc-Glu, którego częścią jest glutation. Poziom glutationu w roślinach jednocześnie traktowanych Cd i suplementowanych Si być może jest niewystarczającym wskaźnikiem potwierdzającym pozytywny wpływ

aplikacji Si w uprawach roślin. Dodatkowym parametrem uzupełniającym poziom glutationu może być ilościowe określenie niebiałkowych tioli (NTPs, ang. *non-protein thiols*), z których po wyłączeniu z glutationu można określić rolę Si w chelatacji Cd przez fitochelatyny [17]. Podobną tendencję w zmniejszeniu zawartości glutationu w roślinach suplementowanych Si i traktowanych Cd wykazali M.A. Farooq i in. (2016), według których obniżenie poziomu glutationu spowodowane jest indukowaniem przez Cd syntezy fitochelatyn, a także niewystarczającą syntezą glutationu.

Traktowanie roślin Cd spowodowało istotny wzrost aktywności GR w analizowanych pędach i korzeniach grochu w porównaniu do aktywności enzymu w badanych częściach roślin kontrolnych (rys. 5C i 5D). Aktywność enzymu w pędach i korzeniach roślin traktowanych Cd była prawie 3-krotnie wyższa w porównaniu z aktywnością GR w roślinach kontrolnych. Zastosowanie suplementacji roślin 1 mM i 2 mM Si z jednoczesnym traktowaniem ich Cd spowodowało istotne obniżenie aktywności GR w pędach i korzeniach (o 83% i 52% oraz 83% i 32%) w porównaniu z pędami i korzeniami roślin traktowanych Cd. W korzeniach roślin suplementowanych 1 mM i 2 mM Si również obserwowano istotne zmniejszenie aktywności GR w porównaniu z aktywnością GR w analizowanych korzeniach roślin kontrolnych. W porównaniu z korzeniami roślin kontrolnych aktywność GR po suplementacji roślin 1 mM i 2 mM Si była niższa odpowiednio o 60% i 44%.

Analizowana aktywność GR, należącej do cyklu Asc-Glu, jest związana z przebiegiem konwersji GSSG do GSH oraz z ochroną integralności błon komórkowych [55]. W przeciwieństwie do zaprezentowanych przez nas wyników aktywności GR, istotnych zmian w aktywności enzymu w korzeniach lucerny nie zaobserwowali A.H. Kabir i in. (2016) – pomimo traktowania roślin 1 mM Cd i/lub suplementowaniem ich 1 mM Si [51]. Z kolei Z. Wu i in. (2017) udowodnili, wykorzystując w badaniach kwitnącą kapustę pekińską, że traktowanie roślin $5 \mu\text{M} \times \text{L}^{-1}$ Si powoduje obniżenie aktywności GR w liściach i korzeniach w porównaniu do roślin kontrolnych. W badaniach wykazali również, że przy zastosowaniu niższych stężeń Si ($1 \mu\text{M} \times \text{L}^{-1}$) aktywność GR była porównywalna z aktywnością w liściach i korzeniach roślin kontrolnych [56]. W prezentowanych przez badaczy wynikach suplementacja roślin Si wraz z jednoczesnym traktowaniem ich Cd potwierdza pozytywne działanie Si w ochronie roślin poddanych stresowi kadmowemu. Łagodzącą rolę Si w indukcji stresu kadmowego w pszenicy udowodnili także S. Thind i in. (2020) [57]. W przedstawionej przez autorów pracy zastosowana suplementacja 3 mM Si, podobnie jak w naszym doświadczeniu, spowodowała obniżenie aktywności GR we wszystkich badanych wariantach pszenicy. Uzyskane wyniki nie wskazywały przy tym na negatywną rolę suplementacji uprawy Si w ochronie roślin narażonych na stres kadmowy. Natomiast jednoczesne traktowanie roślin Cd i suplementowanie ich Si oraz zastosowanie tych związków osobno może w różnym stopniu wpływać na rośliny oraz w rezultacie dawać różne dane analizowanych parametrów. Wyniki prowadzonych badań są uzależnione od gatunku roślin, stężenia zastosowanych związków, fazy rozwojowej roślin podczas traktowania/suplementacji, czasu działania związków w uprawie, sposobu ich podania oraz czasu od zakończenia traktowania/suplementowania roślin do zakończenia uprawy. Przedstawione w niniejszej pracy analizy były wykonane po 21 dniach od zakończenia traktowania/suplementowania roślin, co może mieć wpływ na uzyskane wyniki w parametrach morfologicznych oraz w zawartości glutationu i aktywności GR związanych z cyklem AsA–GSH, który jest nieodłączną częścią ochrony antyoksydacyjnej roślin.

4. Podsumowanie

Traktowanie roślin Cd wpłynęło na zwiększenie aktywności GR w pędach i korzeniach grochu. Natomiast zastosowanie Si powodowało zarówno zmniejszenie zawartości glutationu w pędach i korzeniach, jak i aktywność reduktazy glutationowej w korzeniach grochu w porównaniu z roślinami kontrolnymi i traktowanymi Cd. Negatywny wpływ traktowania roślin Cd wykazano poprzez analizę suchej masy i całkowitej zawartości wody w pędach i korzeniach oraz ich względne wydłużenie. Wykazano także, że suplementacja roślin Si wpływa korzystnie na te 3 parametry. Jednoczesna aplikacja Si i traktowanie roślin Cd spowodowały istotne obniżenie aktywności reduktazy glutationowej, której rolą jest konwersja GSSG do GSH. Suplementacja roślin Si i ich traktowanie Cd wpłynęły również na obniżenie zawartości glutationu w badanych tkankach. Zaobserwowane w doświadczeniu zmiany zarówno w aktywności GR, jak i w poziomie nieenzymatycznych składników systemu antyoksydacyjnego wskazują na udział GR w procesie przemiany glutationu.

Podziękowania

Praca została wykonana dzięki wsparciu finansowemu grantu NCN Opus 18 2019/35/B/ST4/02791 (2020-2024) z Narodowego Centrum Nauki w Krakowie (Polska).

Literatura

1. Zagorchev L., Seal C.E., Kranner I., Odjakova M.J., *A central role for thiols in plant tolerance to abiotic stress*, International Journal of Molecular Sciences, 14, 2013, s. 7405-7432.
2. Labudda M., Safiul Azam F.M., *Glutathione-dependent responses of plants to drought. A review*, Acta Societatis Botanicorum Poloniae, 1, 2014, s. 3-12.
3. Saini R., Saini H.S., Dahiya A., *Iron treatment enhances the levels of reduced glutathione, oxidized glutathione and glutathione reductase activity in Rice (Oryza sativa L.)*, Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 6, 2017, s. 1321-1328.
4. Noctor G., Foyer C.H., *Ascorbate and glutathione. Keeping active oxygen under control*, Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 49, 1998, s. 249-279.
5. Dorion S., Ouellet J.C., Rivoal J., *Glutathione metabolism in plants under stress: beyond reactive oxygen species detoxification*, Metabolites, 11, 2021, s. 1-32.
6. Das K., Roychoudhury A., *Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants*, Frontiers in Environmental Science, 2, 2014, s. 1-13.
7. Coleman J.O.D., Blake-Kalff M.M.A., Davies T.G.E., *Detoxification of xenobiotics by plants. Chemical modification and vacuolar compartmentation*, Trends in Life Sciences, 4, 1997, s. 144-151.
8. Czeczot H., Skrzycki M., Majewska M., Podsiad M., Karlik W., Grono D., Wiechetek M., *Zmiany aktywności enzymów GSH-zależnych w izolowanych hepatocytach szczura poddanych działaniu kadmu*, Bromatologia i Chemia Toksykologiczna, 4, 2009, s. 1167-1176.
9. Homayoonzadeh M., Ghamari M., Talebi K., Allahyari H., Nozari J., *sulfur application amends detoxification processes in eggplant in response to excessive doses of thiacloprid*, Biology and Life Sciences Forum, 11, 2022, s. 1-5.
10. Foyer C.H., Souriau N., Perret S., Lelandais M., Kunert K.J., Pruvost C., Jouanin L., *Overexpression of glutathione reductase but not glutathione synthetase leads to increases in antioxidant capacity and resistance to photoinhibition in poplar trees*, Plant Physiology, 109, 1995, s. 1047-1057.

11. Rahantaniaina M.S., Tuzet A., Mhamdi A., Noctor G., *Missing links in understanding redox signaling via thiol/disulfide modulation. How is glutathione oxidized in plants?*, *Frontiers in Plant Science*, 4, 2013, s. 1-13.
12. Zagorchev L., Seal C., Kranner I., Odjakova M., *A central role for thiols in plant tolerance to abiotic stress*, *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 2013, s. 7405-7432.
13. Bloem E., Haneklaus S., Schnug E., *Suitability of the ratio between reduced and oxidized glutathione as an indicator of plant stress*, [w:] De Kok L.J., Hawkesford M.J., Rennenberg H., Saito K., Schnug E. (red.), *Molecular physiology and ecophysiology of sulfur*, Springer, Switzerland, 2015, s. 115-122.
14. Schulz G.E., Schirmer R.H., Sachsenheimer W., Pai E.F., *The structure of the flavoenzyme glutathione reductase*, *Nature*, 273, 1978, s. 120-124.
15. Hasanuzzaman M., Bhuyan M.H.M.B., Anee T.I., Parvin K., Nahar K., Mahmud J.A., Fujita M., *Regulation of ascorbate-glutathione pathway in mitigating oxidative damage in plants under abiotic stress*, *Antioxidants*, 8, 2019, s. 1-50.
16. Reddy A.R., Raghavendra A.S., *Photooxidative stress*, [w:] Madhava Rao K.V., Raghavendra A.S., Reddy A.R. (red.), *Physiology and molecular biology of stress. Tolerance in plants*, Springer, The Netherlands, 2006, s. 157-186.
17. Farooq M.A., Detterbeck A., Clemens S., Dietz K.J., *Silicon-induced reversibility of cadmium toxicity in rice*, *Journal of Experimental Botany*, 11, 2016, s. 3573-3585.
18. Meng X., Luo S., Dawuda M.M., Gao X., Wang S., Xie J., Tang Z., Liu Z., Wu Y., Jin L., Lyu J., Yu J., *Exogenous silicon enhances the systemic defense of cucumber leaves and roots against CA-induced autotoxicity stress by regulating the ascorbate-glutathione cycle and photosystem II*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 227, 2021, s.1-11.
19. Yin L., Mano J., Tanaka K., Wang S., Zhang M., Deng X., Zhang S., *High level of reduced glutathione contributes to detoxification of lipid peroxide-derived reactive carbonyl species in transgenic Arabidopsis overexpressing glutathione reductase under aluminum stress*, *Physiologia Plantarum*, 161, 2017, s. 211-223.
20. Xia F., Cheng H., Chen L., Zhu H., Mao P., Wang M., *Influence of exogenous ascorbic acid and glutathione priming on mitochondrial structural and functional systems to alleviate aging damage in oat seeds*, *BMC Plant Biology*, 1, 2020, s. 1-11.
21. Mhamdi A., Van Breusegem F., *Reactive oxygen species in plant development*, *Development*, 15, 2018, s. 1-12.
22. Mittler R., Zandalinas S.I., Fichman Y., Van Breusegem F., *Reactive oxygen species signalling in plant stress responses*, *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 23, 2022, s. 663-679.
23. Castro B., Citterico M., Kimura S., Stevens D.M., Wrzaczek M., Coaker G., *Stress-induced reactive oxygen species compartmentalization, perception and signalling*, *Nature Plants*, 4, 2021, s. 403-412.
24. Song J., Feng S.J., Chen J., Zhao W.T., Yang Z.M., *A cadmium stress-responsive gene AtFC1 confers plant tolerance to cadmium toxicity*, *BMC Plant Biology*, 1, 2017, s. 1-15.
25. Tran T.A., Popova L.P., *Functions and toxicity of cadmium in plants. Recent advances and future prospects*, *Turkish Journal of Botany*, 37, 2013, s. 1-13.
26. Garnier L., Simon-Plas F., Thuleau P., Agnel J.P., Blein J.P., Ranjeva R.J., Montillet L., *Cadmium affects tobacco cells by a series of three waves of reactive oxygen species that contribute to cytotoxicity*, *Plant, Cell and Environment*, 29, 2006, s. 1956-1969.
27. Thind S., Hussain I., Ali S., Rasheed R., Ashraf M.A., *Silicon application modulates growth, physio-chemicals, and antioxidants in wheat (Triticum aestivum L.) exposed to different cadmium regimes*, *Dose Response*, 19, 2021, s. 1-15.
28. Knight C.T.G., Kinrade S.D., *A primer on the aqueous chemistry of silicon*, [w:] Datnoff L.E., Snyder G.H., Korndörfer G.H. (red.), *Silicon in Agriculture*, Elsevier Science, 2001, s. 57-81.

29. Głowacka K., Szultka-Młyńska M., Cichorek M., Orzół A., Rogowska A., Cruzado-Tafur E., Pomastowski., Górecki R., Buszewski B., *Znaczenie krzemu dla wybranych gatunków roślin*, Kosmos, 71, 2022, s. 35-44.
30. Wang M., Gao L., Dong S., Sun Y., Shen Q., Guo S., *Role of silicon on plant-pathogen interactions*, Frontiers in Plant Science, 8, 2017, s. 1-14.
31. Pereira T.S., Pereira T.S., de Carvalho Souza C.L.F., Lima E.J.A., Batista B.L., da Silva Lobato A.K., *Silicon deposition in roots minimizes the cadmium accumulation and oxidative stress in leaves of cowpea plants*, Physiology and Molecular Biology of Plants, 1, 2018, s. 99-114.
32. Batool T., Javied S., Ashraf K., Sultan K., Zaman Q.U., Haider F.U., *Alleviation of cadmium stress by silicon supplementation in peas by the modulation of morpho-physio-biochemical variables and health risk assessment*, Life, 12, 2022, s. 1-16.
33. Rahman M.F., Ghosal A., Alam M.F., Kabir A.H., *Remediation of cadmium toxicity in field peas (Pisum sativum L.) through exogenous silicon*, Ecotoxicology and Environmental Safety, 135, 2017, s. 165-172.
34. Jasinski M., Ducos E., Martinoia E., Boutry M., *The ATP-binding cassette transporters: structure, function, and gene family comparison between rice and Arabidopsis*, Plant Physiology, 131, 2003, s. 1169-1177.
35. Gallego S.M., Pena L.B., Barcia R.A., Azpilicueta C.E., Iannone M.F., Rosales E.P., Zawoznik M.S., Groppa M.D., Benavides M.P., *Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants. Insight into regulatory mechanisms*, Environmental and Experimental Botany, 83, 2012, s. 33-46.
36. Haider F.U., Liqun C., Coulter J.A., Cheema S.A., Wu J., Zhang R., Wenjun M., Farooq M., *Cadmium toxicity in plants. Impacts and remediation strategies*, Ecotoxicology and Environmental Safety, 211, 2021, s. 1-22.
37. Li C., Tang Y., Gu F., Wang X., Yang W., Han Y., Ruan Y., *Phytochemical analysis reveals an antioxidant defense response in Lonicera japonica to cadmium-induced oxidative stress*, Scientific Reports, 2022, s. 1-13.
38. Ming D.F., Pei Z.F., Naeem M.S., Gong H.J., Zhou W.J., *Silicon alleviates PEG-induced water-deficit stress in upland rice seedlings by enhancing osmotic adjustment*, Journal of Agronomy and Crop Science, 198, 2012, s. 14-26.
39. Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W., *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*, Nature Methods, 9, 2012, s. 671-675.
40. Furukawa J., Yamaji N., Wang H., Mitani N., Murata Y., Sato K., Katsuhara M., Takeda K., Ma J.F., *An aluminum-activated citrate transporter in barley*, Plant Cell Physiology, 48, 2007, s. 1081-1091.
41. Sahoo S., Awasthi J.P., Sunkar R., Panda S.K., *Determining glutathione levels in plants*, Methods in Molecular Biology, 1631, 2017, s. 273-277.
42. Zhang J., Kirkham M.B., *Antioxidant responses to drought in sunflower and sorghum seedlings*, The New Phytologist, 3, 1996, s. 361-373.
43. Bradford M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*, Analytical Biochemistry, 72, 1976, s. 248-254.
44. Idrees S., Shabir S., Ilyas N., Batool N., Kanwal S., *Assessment of cadmium on wheat (Triticum aestivum L.) in hydroponics medium*, Agrociencia, 49, 2015, s. 917-929.
45. Anwar I. S., Shafiq F., Nisa Z.U., Usman U., Ashraf M.Y., Ali N., *Effect of cadmium stress on seed germination, plant growth and hydrolyzing enzymes activities in mungbean seedlings*, Journal of Seed Science, 43, 2021, s. 1-10.
46. Bavi K., Kholdebarin B., Mordshahi A., *Effect of cadmium on growth, protein content and peroxidase activity in pea plants*, Pakistan Journal of Botany, 43, 2011, s. 1467-1470.

47. Yildirim E., Ekinici M., Turan M., Ağar G., Ör S., Dursun A., Kul R., Bal T., *Impact of cadmium and lead heavy metal stress on plant growth and physiology of rocket (Eruca sativa L.)*, KSU Journal of Agriculture and Nature, 22, 2019, s. 843-850.
48. Krantev A., Yordanova R., Janda T., Szalai G., Popova L., *Treatment with salicylic acid decreases the effect of cadmium on photosynthesis in maize plants*, Journal of Plant Physiology, 165, 2008, s. 920-931.
49. El-Okkiah S.A.F., El-Tahan A.M., Ibrahim O.M., Taha M.A., Korany S.M., Alsherif E.A., Abdelgawad H., Abo Sen E.Z.F., Sharaf-Eldin M.A., *Under cadmium stress, silicon has a defensive effect on the morphology, physiology, and anatomy of pea (Pisum sativum L.) plants*, Frontiers in Plant Science, 13, 2022, s. 1-19.
50. Rostami M., Mohammadi H., Müller T., Mirzaeitalarposhti R., *Silicon application affects cadmium translocation and physiological traits of Lallemandia royleana under cadmium stress*, Journal of Plant Nutrition, 43(5), 2020, s. 753-761.
51. Kabir A.H., Hossain M.M., Khatun M.A., Mandal A., Haider S.A., *Role of silicon counteracting cadmium toxicity in alfalfa (Medicago sativa L.)*, Frontiers in Plant Science, 7, 2016, s. 1-12.
52. Mendoza-Cózatl D.G., Butko E., Springer F., Torpey J.W., Komives E.A., Kehr J., Schroeder J.I., *Identification of high levels of phytochelatin, glutathione and cadmium in the phloem sap of Brassica napus. A role for thiol-peptides in the long-distance transport of cadmium and the effect of cadmium on iron translocation*, The Plant Journal, 2, 2008, s. 249-259.
53. Grill E., Löffler S., Winnacker E.L., Zenk M.H., *Phytochelatin, the heavy metal binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific gamma-glutamylcysteine depeptidyl transpeptidase (Phytochelatin synthase)*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 86, 1989, s. 6838-6842.
54. Alam P., Balawi T.H., Altalayan F.H., Hatamleh A.A., Ashraf M., Ahmad P., *Silicon attenuates the negative effects of chromium stress in tomato plants by modifying antioxidant enzyme activities, ascorbate-glutathione cycle and glyoxalase system*, Acta Physiologiae Plantarum, 43, 2021, s. 1-17.
55. Gill S.S., Anjum N.A., Hasanuzzaman M., Gill R., Trivedi D.K., *Glutathione and glutathione reductase. A boon in disguise for plant abiotic stress defense operations*, Plant Physiology and Biochemistry, 70, 2013, s. 204-212.
56. Wu Z., Liu S., Zhao J., Wang F., Du Y., Zou S., Li H., Wen D., Huang Y., *Comparative responses to silicon and selenium in relation to antioxidant enzyme system and the glutathione-ascorbate cycle in flowering Chinese cabbage (Brassica campestris L. ssp. chinensis var. utilis) under cadmium stress*, Environmental and Experimental Botany, 133, 2017, s. 1-11.
57. Thind S., Hussain I., Ali S., Hussain S., Rasheed R., Ali B., Hussain H.A., *Physiological and biochemical bases of foliar silicon-induced alleviation of cadmium toxicity in wheat*, Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 4, 2020, s. 2714-2730.

Zmiana w zawartości glutationu i aktywności reduktazy glutationowej u grochu (*Pisum sativum* L.) w odpowiedzi na suplementację krzemem podczas stresu kadmowego

Streszczenie

Krzem jest jednym z najobficiej występujących pierwiastków w skorupie ziemskiej. Choć Si nie jest uważany za pierwiastek niezbędny dla roślin wyższych, udowodniono jego korzystny wpływ na wzrost i rozwój wielu gatunków roślin, szczególnie w warunkach stresowych. Ekspozycja roślin na czynniki stresowe (takie jak metale ciężkie) powoduje wystąpienie w nich stresu oksydacyjnego i nadprodukcję reaktywnych form tlenu (RFT). Niniejsze badania przeprowadzono w celu określenia zawartości glutationu i aktywności reduktazy glutationowej (GR) w roślinach suplementowanych Si i poddanych stresowi kadmowemu – ze względu na

istotną rolę, jaką pełnią w cyklu askorbinianowo–glutationowym. Zbadano podstawowe parametry biometryczne, poziom glutationu utlenionego (GSSG) i zredukowanego (GSH) oraz aktywność GR w pędach i korzeniach grochu zwyczajnego (*Pisum sativum* L.) w warunkach stresu wywołanego obecnością Cd. W doświadczeniu wykorzystano rośliny, które traktowano Cd (50 μ M CdSO₄) i/lub suplementowano 1 mM Na₂SiO₃ lub 2 mM Na₂SiO₃. Doświadczenie przeprowadzono w uprawie hydroponicznej w warunkach kontrolowanych. Analizy biochemiczne zostały wykonane z wykorzystaniem metod spektrofotometrycznych. Zastosowanie Si zmniejszyło zawartość GSH w roślinach poddanych stresowi Cd. Suplementacja Si spowodowała również znaczne obniżenie aktywności GR, którego rolą jest konwersja GSSG do GSH. Uzyskane wyniki umożliwiły określenie wpływu Si na poziom glutationu i aktywność GR w warunkach stresu kadmowego.

Słowa kluczowe: glutation, reduktaza glutationowa, groch zwyczajny, krzem, kadm

Changes in glutathione content and glutathione reductase activity in silicon supplementation during cadmium stress in pea (*Pisum sativum* L.)

Abstract

Silicon is one of the most abundant elements in the earth's crust. Although Si is not considered an essential element for higher plants, it has been proven to benefit the growth and development of many plant species, especially under stressful conditions. Plant exposure to stress factors (such as heavy metals) causes oxidative stress and overproduction of reactive oxygen species (ROS). This study was conducted to determine the glutathione content and glutathione reductase activity in plants of Si supplementation in plants under cadmium stress (Cd), due to their important role in the ascorbate-glutathione cycle. The level of oxidized glutathione (GSSG) and reduced glutathione (GSH), as well as the activity of glutathione reductase (GR) in shoots and roots of pea (*Pisum sativum* L.) under stress caused by the presence of Cd, were examined. The plants treated with Cd (50 μ M CdSO₄), and/or supplemented with 1 or 2 mM Na₂SiO₃ were used in the experiment. The experiment was carried out in hydroponic cultivation under controlled conditions. Biochemical analyzes were performed using spectrophotometric methods. Supplementation of Si reduced the content of GSH in plants under the stress of Cd. Supplementation with Si also caused a significant decrease in the activity of GR, the role of which is the conversion of GSSG to GSH. The obtained results made it possible to determine the effect of Si on glutathione levels and GR activity under cadmium stress conditions.

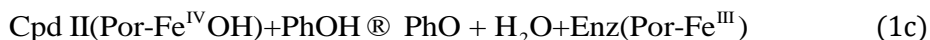
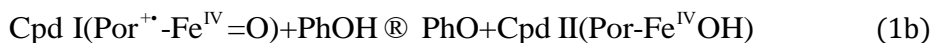
Keywords: glutathione, glutathione reductase, pea, silicon, cadmium

Metoda wyznaczania energii aktywacji i dezaktywacji bioprocessów z zastosowaniem immobilizowanych enzymów

1. Wprowadzenie

Związki fenolowe trwale zanieczyszczają ekosystemy wodne głównie ze względu na ich szkodliwy wpływ na organizmy, nawet w bardzo niskich stężeniach [1-3]. Toksyczna woda może wywołać u ludzi poważne problemy zdrowotne, takie jak uszkodzenie mózgu, ośrodkowego układu nerwowego i wątroby. Zatem usuwanie toksycznych związków fenolowych jest ważnym problemem środowiskowym. W oczyszczaniu ścieków opracowano różne metody, takie jak proces adsorpcji, degradacja biochemiczna, koagulacja, proces membranowy i degradacja oksydacyjna [4]. Procesy biomembranowe są również coraz częściej stosowane do oczyszczania wody z zanieczyszczeń organicznych.

Peroksydaza chrzanowa może katalizować utlenianie fenolu, a także aniliny, bisfenolu, benzydyny i pokrewnych związków heteroaromatycznych. Toksyczne związki są przekształcane w mniej szkodliwe związki w procesie enzymatycznym, więc nie jest wymagana dalsza degradacja. W porównaniu z katalizatorami chemicznymi katalityczne działanie enzymów jest bardziej wydajne i selektywne. Peroksydaza chrzanowa nadaje się do oczyszczania ścieków, ponieważ utrzymuje swoją aktywność w szerokim zakresie pH i temperatury [5]. Reakcja katalityczna peroksydazy przebiega w 3 etapach z udziałem 2 substratów. Początkowy etap obejmuje utlenianie nadtlaniem wodoru H_2O_2 peroksydazy z wytworzeniem niestabilnego związku pośredniego Cpd I – równanie (1a). W drugim etapie substrat pierwszy, będący donorem elektronów, redukuje Cpd I do Cpd II – równanie (1b). Następnie drugi substrat redukuje Cpd II, aby przywrócić stan początkowy enzymu – równanie (1c) [6, 7].



Projektowanie oraz modelowanie bioprocessów jest możliwe, jeżeli znane są parametry kinetyczne procesu.

Celem analiz było wyznaczenie parametrów optymalnych temperatur T_{opt} , energii aktywacji E_r i energii dezaktywacji E_d dla peroksydazy chrzanowej unieruchomionej na zmodyfikowanej membranie oraz nanowłóknie. Uzyskane wartości można wykorzystać w projektowaniu i modelowaniu procesu usuwania fenolu z wód przez peroksydazę chrzanową w enzymatycznym reaktorze membranowym [8].

¹ jmilek@pbs.edu.pl, Zakład Inżynierii Chemicznej i Bioprocessowej, Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej, Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich, <https://wtiich.pbs.edu.pl/pl/pracownik/justyna-milek>.

2. Metody

2.1. Peroksydaza chrzanowa unieruchomiona na membranie z kopolimeru akrylonitrylowego

Modyfikację membrany z kopolimeru akrylonitrylu (AN) przeprowadził zespół Vasileva i in. [5, 9] poprzez sekwencyjną obróbkę membrany z użyciem wodorotlenku sodu i etylenodiaminy. Następnie część membrany z kopolimeru AN umieszczono na 60 minut w 25% wodnym roztworze aldehydu glutarowego w temperaturze 4°C. Membranę zanurzano w roztworze peroksydazy chrzanowej o stężeniu 1 mg/ml, przygotowanym w 0,1 mol/dm³ buforu fosforanowego o pH równym 7,0. Przy optymalnym stężeniu nadtlenu wodoru równym 0,028 mol/dm³ oraz stężeniu fenolu równym 100 mg/dm³ unieruchomiona peroksydaza chrzanowa na membranie i wolna peroksydaza chrzanowa powodowały rozkład fenolu odpowiednio o 95,4% i 73,3%.

2.2. Peroksydaza chrzanowa unieruchomiona na nanowłóknach PVA-PAAm

Roztwór poli(alkoholu winylowego) (PVA) i roztwór poliakrylamidu (PAAm) poddano polimeryzacji. Proces ten opisali Temoćin i in. (2018) [3]. Mieszaniny mieszano przez 2 godziny w temperaturze 45°C w celu uzyskania roztworu przedzalniczego. Warunkiem elektroprzędzenia było wysokie napięcie 25 kV i szybkość przepływu 1,5 µl/min. Nanowłókna PVA-PAAm modyfikowano chemicznie przez wytrząsanie z roztworami NaOCl i NaOH w temperaturze 20°C przez 1 godzinę. W ten sposób na nanowłóknach powstały grupy aminowe. Następnie nanowłókna umieszczono w 2% roztworze aldehydu glutarowego na 4 godziny. Potem nanowłókna zanurzano na 18 godzin w roztworze peroksydazy chrzanowej o stężeniu 0,03 mg/ml przygotowanym w 0,05 mol/dm³ buforu fosforanowego o pH 7,0.

2.3. Aktywność peroksydazy chrzanowej unieruchomionej na membranie AN oraz nanowłóknie PVA-PAAm w zależności od temperatury

Aktywność peroksydazy chrzanowej wolnej i unieruchomionej na membranie AN oraz nanowłóknie PVA-PAAm mierzono spektrofotometrycznie. Dla peroksydazy chrzanowej unieruchomionej na AN pomiarów dokonywano przy długości fali 460 nm. Badano zmianę stężenia o-dianizydyny w czasie reakcji 10 minut [5]. Natomiast dla peroksydazy chrzanowej unieruchomionej na nanowłóknie PVA-PAAm pomiary dokonywano przy długości fali 420 nm. Badano zmianę pirogalolu w czasie reakcji 3 minut [3].

Parametry optymalnych temperatur T_{opt} , energii aktywacji E_r i energii dezaktywacji E_d dla peroksydazy chrzanowej na zmodyfikowanej membranie i nanowłóknie oszacowano na podstawie krzywych zmiany aktywności w zależności od temperatury [3, 5].

Wartości energii aktywacji E_r i E_d można wyznaczyć z krzywych zależności Arrheniusa, tj. logarytmu stałej szybkości reakcji ($\ln k$) lub stałej szybkości dezaktywacji ($\ln k_d$) w zależności od odwrotności temperatury ($1/T$) [7, 10]. Wykazano, że wyznaczone wartości E_r i E_d przy zastosowaniu zależności Arrheniusa są obarczone błędem [11].

Analizując bioprocesy z użyciem peroksydazy chrzanowej na zmodyfikowanej membranie i nanowłóknach, zakłada się, że zmiana stężenia substratu C_s w czasie reakcji t i zmiana aktywności bezwymiarowej a [12, 13] są opisane równaniami I rzędu:

$$\frac{dC_s}{dt} = -kC_E \quad (2a)$$

$$\frac{da}{dt} = -k_d a \quad (2b)$$

gdzie: k – stała szybkości reakcji enzymatycznej (min^{-1}), k_d – stała szybkości procesu dezaktywacji (min^{-1}), C_E – stężenie aktywnego enzymu (mol/dm^3).

Stała kinetyczna k zależy od temperatury T , jest opisana równaniem Arrheniusa w postaci:

$$k = k_0 \exp(-E_r / RT) \quad (3)$$

gdzie: k_0 – współczynnik wykładniczy stałej kinetycznej (min^{-1}), E_r – energia aktywacji (kJ/mol), R – stała gazowa $8,314 \text{ J/(mol} \cdot \text{K)}$.

Stała kinetyczna procesu dezaktywacji peroksydazy chrzanowej k_d również zależy od temperatury T , zgodnie z równaniem Arrheniusa:

$$k_d = k_{d0} \exp(-E_d / RT) \quad (4)$$

gdzie: k_{d0} – współczynnik wykładniczy stałej kinetycznej procesu dezaktywacji (min^{-1}), E_d – energia aktywacji procesu dezaktywacji (kJ/mol).

Analizy równania (2a) i równania (2b), opisujących odpowiednio zmiany stężenia i zmiany aktywności enzymu w czasie, zostały przedstawione we wcześniejszej pracy [11]. Po analizie ostatecznie otrzymano równanie opisujące wpływ temperatury na bezwymiarową aktywność enzymów – opisaną równaniami (5a) i (5b):

$$a = \frac{\{1 - \exp(-\theta \exp E)\} \exp(E E_d / (\exp \theta - 1))}{1 - \exp(-\theta)} \quad (5a)$$

gdzie: parametr E opisuje zależność.

$$E = \frac{(T_{\text{opt}} - T) E_d}{R T T_{\text{opt}}} \quad (5b)$$

gdzie: T_{opt} – optymalna temperatura dla peroksydazy chrzanowej (K). Bezwymiarowy parametr θ jest określony równaniem.

$$\theta = t_a k_{d0} \exp(-E_d / R T_{\text{opt}}) = t_a k_d (T_{\text{opt}}) \quad (6)$$

gdzie: t_a – czas reakcji oznaczania aktywności peroksydazy chrzanowej na membranie AN oraz nanowłóknice PVA-PAAm (min).

Gdy znane są wartości parametru bezwymiarowego θ oraz energii procesu dezaktywacji E_d , możliwe jest obliczenie wartości energii aktywacji E_r z zależności:

$$E_r = E_d - \frac{\theta E_d}{\exp \theta - 1} \quad (7)$$

Na podstawie równań (5a) i (5b) wyznaczono parametry T_{opt} , θ i E_d za pomocą procedury Levenberga-Marquardta [11, 14–19] poprzez określenie minimalnej sumy kwadratów odchyleń (*SSE*).

Równania (5)–(7) zostały zastosowane do wyznaczenia optymalnych temperatur i energii aktywacji w innych bioprocessach z użyciem enzymów, m.in. hydrolizy oliwy z oliwek przez lipazę z trzustki wieprzowej [11], hydrolizy skrobi przez α -amylazę z trzustki wieprzowej [16], hydrolizy inuliny przez rekombinowane [17] i nierekombinowane [18] egzoinulinazy oraz rozkładu 2,4-dichlorofenolu przez peroksydazę chrzanową unieruchomioną na zmodyfikowanej błonie nanowłóknistej [20].

3. Wyniki analiz

Przeanalizowano dane literaturowe (Vasileva i in. [5] oraz Temoćin i in. [3]) dla peroksydazy chrzanowej unieruchomionej na zmodyfikowanych membranie AN lub nanowłóknach PVA-PAAm. Aktywność peroksydazy chrzanowej wolnej i unieruchomionej określono przy użyciu o-dianizydyny lub pirogalolu (odpowiednio w pomiarach Vasileva i in. [5] oraz Temoćin i in. [3]), a także nadtlenu wodoru – jako substratów w obu testach. W pierwszym badaniu [5] użyto 1-molowego roztworu H_2O_2 , oraz 0,0004-molowego roztworu o-dianizydyny o pH równym 5 dla immobilizowanego enzymu i w pH równym 4,2 dla wolnego enzymu. Następnie do przygotowanej mieszaniny dodano 10 mg/ml roztworu peroksydazy chrzanowej o pH 4,2. Aktywność peroksydazy chrzanowej unieruchomionej na membranie AN oznaczano poprzez utlenianie o-dianizydyny nadtlakiem wodoru w czasie 10 minut, z jednoczesną zmianą zabarwienia roztworu oznaczoną spektrofotometrycznie przy długości fali 460 nm [5].

W drugim badaniu [3] dla oznaczenia aktywności peroksydazy chrzanowej zmieszano: 0,02-molowy roztwór pirogalolu, 0,01-molowy roztwór nadtlenu wodoru oraz roztwór wolnej peroksydazy chrzanowej (10 $\mu\text{g/ml}$) lub unieruchomionej peroksydazy chrzanowej (4 mg nanowłókien PVA-PAAm). Roztwory te inkubowano w łaźni wodnej z wytrząsaniem przez 3 minuty dla wolnej peroksydazy chrzanowej oraz przez 5 minut dla unieruchomionej peroksydazy chrzanowej. Aktywność peroksydazy chrzanowej monitorowano spektrofotometrycznie przy długości fali 420 nm.

Jednostkę (U) peroksydazy chrzanowej zdefiniowano jako ilość peroksydazy chrzanowej, która utleniała 1 μmol substratu na minutę ($U = \mu\text{mol min}^{-1}$) w warunkach testu.

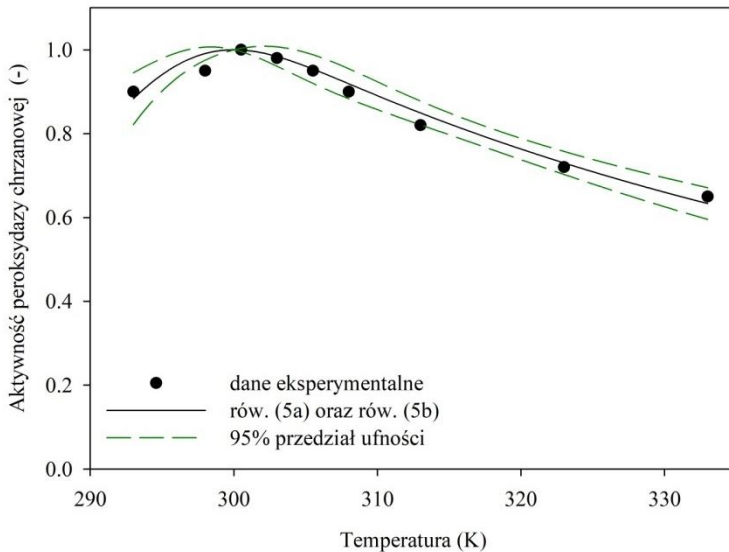
Na podstawie danych doświadczalnych dotyczących zmiany aktywności peroksydazy chrzanowej (Vasileva i in. [5] oraz Temoćin i in. [3]) w funkcji temperatury wyznaczono wartości optymalnych temperatur T_{opt} , energii dezaktywacji E_d i parametrów θ z równań (5a) oraz (5b). Uzyskane wartości przedstawiono w tabeli 1 wraz ze wzrostem wartości temperatur optymalnych. Następnie wartości E_r zostały obliczone na podstawie równania (7). Wartości E_r również zostały przedstawione w tabeli 1.

Tabela 1. Wartości parametrów wyznaczonych dla peroksydazy chrzanowej natywnej unieruchomionej na membranie AN oraz nanowłóknach PVA-PAAm

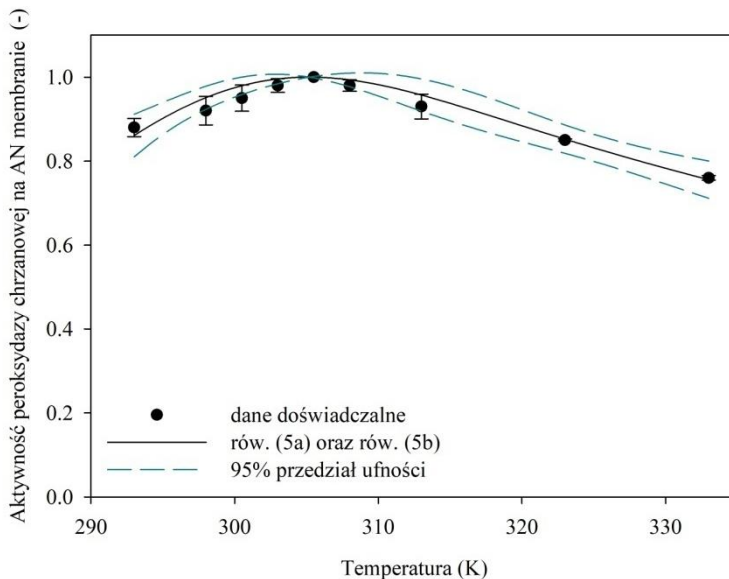
Peroksydaza chrzanowa	T_{opt} (K)	θ	E_d (kJ/mol)	E_r (kJ/mol)
wolna*	300,00 \pm 0,80	3,04 \pm 0,30	83,73 \pm 14,46	70,94 \pm 13,44
membrana AN*	305,18 \pm 1,32	2,63 \pm 0,45	52,85 \pm 7,42	42,05 \pm 9,27
wolna**	316,38 \pm 0,90	0,69 \pm 0,21	125,04 \pm 10,94	37,73 \pm 13,01
nanowłókna PVA-PAAm**	324,38 \pm 1,22	0,45 \pm 0,21	197,61 \pm 52,38	41,14 \pm 25,80

* Vasilevai in., 2009 [5]; **Temoćini in., 2018 [3]

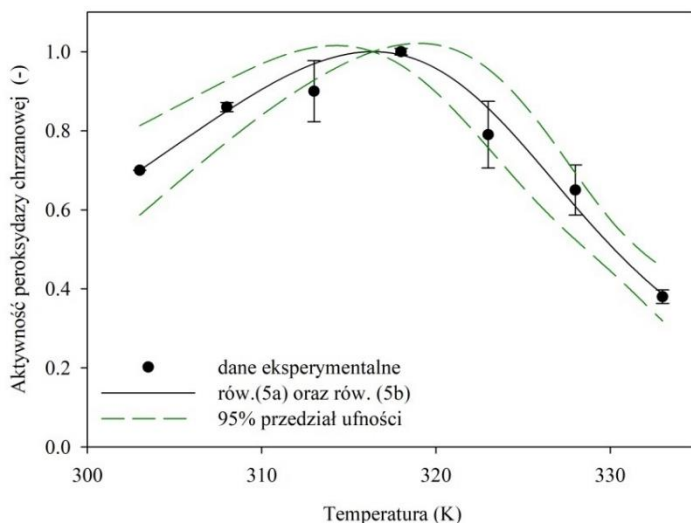
Na rysunkach 1-4 przedstawiono dane eksperymentalne dotyczące bezwymiarowej aktywności peroksydazy chrzanowej w funkcji temperatury oraz krzywe bezwymiarowej aktywności wykreślone na podstawie równań (5a) oraz (5b).



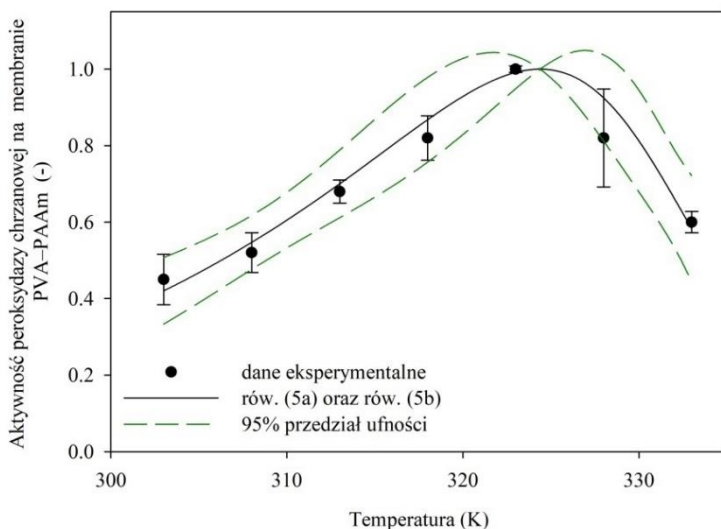
Rysunek 1. Bezwymiarowa aktywność wolnej peroksydazy chrzanowej; o-dianizydyna jako substrat, pH 4,2, czas pomiaru 10 minut; opracowanie własne na podstawie [5]



Rysunek 2. Bezwymiarowa aktywność peroksydazy chrzanowej immobilizowanej na membranie akrylonitrylu AN, o-dianizydyna jako substrat, pH 4,2, czas 10 minut; opracowanie własne na podstawie [5]



Rysunek 3. Bezwymiarowa aktywność wolnej peroksydazy chrzanowej; pirogalol jako substrat, pH 7,0, czas 3 minuty; opracowanie własne na podstawie [3]



Rysunek 4. Bezwymiarowa aktywność peroksydazy chrzanowej immobilizowanej na nanowłóknie PVA-PAAM, pirogalol jako substrat, pH 7,0, czas 3 minuty; opracowanie własne na podstawie [3]

W tabeli 2 przedstawiono dane statystyczne uzyskane podczas oznaczania parametrów peroksydazy chrzanowej. W większości analizowanych przypadków odnotowano wysokie wartości współczynnika regresji (R^2 powyżej 0,93). Otrzymano sumę kwadratów odchyleń SSE poniżej 0,084. Wartości testu Fishera (test F) były powyżej 29,00 z wartością niskiego prawdopodobieństwa w większości analizowanych przypadków P poniżej 0,0040. Dane statystyczne peroksydazy chrzanowej potwierdzają, iż właściwe było użycie równania (5a) oraz (5b) w celu identyfikacji parametrów. Powszechnie stosowana wartość prawdopodobieństwa jest znacznie wyższa: $P < 0,05$ [11, 20].

Tabela 2. Dane statystyczne wyznaczone dla wartości parametrów T_{opt} , E_d , θ peroksydazy chrzanowej

Peroksydaza chrzanowa	SSE	R^2	p			F	P
			E_d (kJ/mol)	T_{opt} (K)	θ (-)		
wolna*	0,0284	0,9753	0,0005	<0,0001	<0,0001	118,56	<0,0001
membrana AN*	0,0256	0,9397	0,0004	<0,0001	0,0011	46,76	0,0002
wolna**	0,0663	0,9774	0,0003	<0,0001	0,0331	86,51	0,0005
nanowłókna PVA-PAAm**	0,0845	0,9367	0,0196	<0,0001	0,0690	29,57	0,0040

*Vasileviiin., 2009 [5]; **Temoćini in., 2018 [3]

Dodatkowo na rysunkach 1-4 przedstawiono odchylenie standardowe punktów doświadczalnych, a dla otrzymanych krzywych zaznaczono 95% przedziały ufności. Zatem dane statystyczne potwierdziły, że użycie równania (5a) oraz równania (5b) jest uzasadnione podczas określenia parametrów T_{opt} , E_d , θ .

4. Dyskusja

4.1. Wartości temperatur optymalnych T_{opt}

Wyznaczone wartości temperatur optymalnych T_{opt} , zamieszczone w tabeli 1, dla natywnej peroksydazy chrzanowej wynoszą $300,00 \pm 0,80$ K oraz $316,38 \pm 0,90$ K. Wyższą wartość T_{opt} uzyskano dla pirogalolu, w porównaniu z o-dianizydyną, będącego substratem w oznaczeniu aktywności peroksydazy chrzanowej. Wyższą wartość T_{opt} otrzymano dla czasu pomiaru 3 razy krótszego.

Wartości optymalnych temperatur T_{opt} dla unieruchomionej peroksydazy chrzanowej na membranie z kopolimeru AN i nanowłóknach PVA-PAAm wyniosły odpowiednio $305,18 \text{ K} \pm 1,32 \text{ K}$ i $324,38 \text{ K} \pm 1,22 \text{ K}$. Dla unieruchomionych peroksydaz chrzanowych otrzymano wyższe wartości T_{opt} niż dla wolnej peroksydazy chrzanowej w odpowiednim układzie eksperymentalnym.

We wcześniejszej pracy [19] wartości optymalnych temperatur T_{opt} peroksydazy chrzanowej wolnej oraz na membranie nanowłóknistej wynosiły odpowiednio $303,21 \text{ K} \pm 1,07 \text{ K}$ oraz $313,64 \pm 1,15 \text{ K}$. Aktywność peroksydazy chrzanowej oznaczono poprzez zastosowanie ABTS (2,2'-azyno-bis-(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonianu)) jako substratu.

4.2. Wartości energii aktywacji E_r i energii dezaktywacji E_d

Uzyskane wartości energii aktywacji E_r dla wolnej peroksydazy chrzanowej wyniosły $70,94 \text{ kJ/mol} \pm 13,44 \text{ kJ/mol}$ oraz $37,73 \text{ kJ/mol} \pm 13,01 \text{ kJ/mol}$. Wartości energii aktywacji E_r dla unieruchomionej peroksydazy chrzanowej na membranie z kopolimeru AN lub nanowłóknach PVA-PAAm wyniosły odpowiednio $42,05 \text{ kJ/mol} \pm 9,27 \text{ kJ/mol}$ i $41,14 \text{ kJ/mol} \pm 25,80 \text{ kJ/mol}$.

Z tabeli 1 wynika, iż dla peroksydazy chrzanowej na membranie kopolimerowej AN uzyskano niższe wartości E_r w porównaniu do wartości E_r dla wolnej peroksydazy chrzanowej [5]. Natomiast dla peroksydazy chrzanowej na nanowłóknach PVA-PAAm wartości E_r były wyższe jedynie o 8% w porównaniu do bezwymiarowej aktywności wolnej peroksydazy chrzanowej [3]. Niższe energie aktywacji odpowiadają wyższym szybkościom reakcji. Wartości energii aktywacji E_r dla peroksydazy chrzanowej – wyznaczone z rów-

niania Arrheniusa – wynosiły 14,63 kJ/mol [21] oraz 17,7 kJ/mol [10]. Hewson i Dunford (1975) [21] otrzymali wartość E_r dla reakcji peroksydazy chrzanowej, przedstawionej równaniem (1a), z jednym substratem (nadtlenkiem wodoru). Natomiast Ostojic i in. (2017) [10] otrzymali wartość E_r dla peroksydazy chrzanowej, której aktywność określano z zastosowaniem guajakolu jako substratu, który charakteryzuje się tym, iż uzyskuje się najwyższe wartości aktywności w porównaniu do innych substratów używanych w oznaczaniu aktywności [21].

W pracy Milek [19] uzyskane wartości energii aktywacji E_r dla wolnej peroksydazy chrzanowej oraz unieruchomionej na błonie nanowłóknistej wyniosły odpowiednio 40,33 kJ/mol \pm 10,72 kJ/mol i 6,39 kJ/mol \pm 4,00 kJ/mol.

Różnica w wartościach E_r może wynikać z metod oznaczania aktywności wolnej peroksydazy chrzanowej. Wiadomo, że zastosowanie o-dianizydyny jako substratu zwiększa około 2-krotnie aktywność w porównaniu z pirogalolem [22].

Uzyskane wartości energii dezaktywacji E_d wolnej peroksydazy chrzanowej określane z użyciem o-dianizydyna oraz pirogalolu jako substratami wyniosły odpowiednio 83,73 kJ/mol \pm 14,46 kJ/mol i 125,04 kJ/mol \pm 10,94 kJ/mol (tab. 1). Wartości E_d dla unieruchomionej peroksydazy chrzanowej na membranie z kopolimeru AN i nanowłóknach PVA-PAAm wyniosły odpowiednio 52,85 kJ/mol \pm 7,42 kJ/mol oraz 197,61 kJ/mol \pm 52,38 kJ/mol. W pracy Milek [19] uzyskana wartość E_d dla peroksydazy chrzanowej na błonie nanowłóknistej wynosiła 215,00 kJ/mol \pm 55,04 kJ/mol.

Niższe wartości E_r oraz wyższe wartości E_d dla peroksydazy chrzanowej immobilizowanej na membranie w porównaniu do wartości E_r i E_d otrzymanych dla peroksydazy chrzanowej wolnej mogą potwierdzać efektywność procesu unieruchomienia na membranie.

Wyznaczone wartości E_r oraz E_d można zastosować w obliczeniach projektowych w procesach z użyciem membrany z peroksydazą chrzanową. Przykładem jest analiza bioreaktora przepływowego ze złożem stałym [23] z zastosowaniem wartości energii dezaktywacji E_d uzyskanej w klasycznym reaktorze okresowym [24].

5. Podsumowanie

Wiele związków fenolowych stanowi zagrożenie dla zdrowia dużej ilości organizmów ze względu na toksyczność. Bardzo ważne staje się usuwanie fenolu przez peroksydazę chrzanową unieruchomioną na zmodyfikowanej błonie i nanowłóknach. Badania miały na celu identyfikację parametrów E_r , E_d i T_{opt} dla peroksydazy chrzanowej wolnej i unieruchomionej na zmodyfikowanej membranie i nanowłóknach. Wartości optymalnych temperatur T_{opt} były wyższe o około 5°C i 8°C odpowiednio dla membrany z kopolimeru AN i nanowłókna PVA-PAAm w porównaniu do wartości T_{opt} otrzymanych dla wolnej peroksydazy chrzanowej. Uzyskane wartości energii dezaktywacji E_d peroksydazy chrzanowej dla immobilizowanej na nanowłóknistej PVA-PAAm były czterokrotnie wyższe niż wartości energii dezaktywacji E_d uzyskane dla peroksydazy chrzanowej na membranie z kopolimeru AN.

Otrzymane wartości E_r , E_d , T_{opt} można stosować do projektowania i modelowania procesu enzymatycznego usuwania fenolu z wody w bioreaktorze membranowym z peroksydazą chrzanową.

Symbole

C_E – stężenie aktywnego enzymu, mol/dm³;
 C_S – stężenie substratu, mol/dm³;
 E_d – energia dezaktywacji peroksydazy chrzanowej, kJ/mol;
 E_r – energia aktywacji reakcji z udziałem peroksydazy chrzanowej, kJ/mol;
 F – wartość testu F (Fisheya);
 k – stała kinetyczna reakcji enzymatycznej, min⁻¹;
 k_d – stała kinetyczna procesu dezaktywacji, min⁻¹;
 k_0 – współczynnik przedwykładniczy stałej kinetycznej reakcji enzymatycznej, min⁻¹;
 P – wartość prawdopodobieństwa parametrów E_d , T_{opt} i θ ;
 R – stała gazowa 8,315 J/(mol · K);
 R^2 – współczynnik regresji;
 SSE – suma kwadratów odchyleń;
 t_a – czas reakcji badania aktywności peroksydazy chrzanowej na zmodyfikowanej membranie lub nanowłóknie, min;
 T – temperatura, K;
 T_{opt} – temperatura, w której peroksydaza chrzanowa wykazuje maksymalną aktywność, K;

symbole greckie

θ – parametr bezwymiarowy określony równaniem (6).

Literatura

1. Antizar-Ladislao B., Galil N.I., *Biosorption of phenol and chlorophenols by acclimated residential biomass under bioremediation conditions in a sandy aquifer*, Water Research, 38, 2004, s. 267-276, DOI: 10.1016/j.watres.2003.09.032.
2. Khenifi A., Zohra B., Kahina B., Houari H., Zoubir D., *Removal of 2,4-DCP from wastewater by CTAB/bentonite using one-step and two-step methods. A comparative study*, Chemical Engineering Journal, 146, 2009, s. 345-354, DOI: 10.1016/j.cej.2008.06.028.
3. Temoçin Z., İnal M., Gökğöz M., Yiğitoğlu M., *Immobilization of horseradish peroxidase on electrospun poly(vinylalcohol)-polyacrylamide blend nanofiber membrane and its use in the conversion of phenol*, Polymer Bulletin, 75, 2018, s. 1843-1865, DOI: 10.1007/s00289-017-2129-5.
4. Vineh M.B., Saboury A.A., Poostchi A.A., Ghasemi A., *Biodegradation of phenol and dyes with horseradish peroxidase covalently immobilized on functionalized RGO-SiO₂ nanocomposite*, International Journal of Biological Macromolecules, 164, 2020, s. 4403-4414, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.09.045.
5. Vasileva N., Godjevargova T., Ivanova D., Gabrovska K., *Application of immobilized horseradish peroxidase onto modified acrylonitrile copolymer membrane in removing of phenol from water*, International Journal of Biological Macromolecules, 44, 2009, s. 190-194, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2008.12.002.
6. Zhang T., Xu X.L., Jin Y.N., Wu J., Xu Z.K., *Immobilization of horseradish peroxidase (HRP) on polyimide nanofibers blending with carbon nanotubes*, Journal of Molecular Catalysis B. Enzymatic, 106, 2014, s. 56-62, DOI: 10.1016/j.molcatb.2014.04.015.
7. Zeyadi M., Almulaiky Y.Q., *A novel peroxidase from Ziziphus jujuba fruit. Purification, thermodynamics and biochemical characterization properties*, Scientific Report, 10(1), 2020, s. 8007, DOI: 10.1038/s41598-020-64599-9.

8. Carvalho C.L.S., Gomes F.M., Pereira F.M., *Mathematical modeling of estrogen degradation in enzymatic membrane reactor*, Industrial Biotechnology, 16(2), 2020, s. 50-55, DOI: 10.1089/ind.2020.29200.csc.
9. Godjevargova T., Gabrovska K., *Kinetic parameters of urease immobilized on modified acrylonitrile copolymer membrane in the presence and absence of Cu(II) ions*, Macromolecular Bioscience, 5, 2005, s. 459-466, DOI: 10.1002/mabi.200400188.
10. Ostojic J., Herenda S., Galijasevic S., Galic B., Milos M., *Inhibition of horseradish peroxidase activity by boroxine derivative, dipotassium-trioxohydroxy tetrafluoroborate $K_2[B_3O_3F_4OH]$* , Journal of Chemistry, 2017, s. 1-7, DOI: 10.1155/2017/8134350.
11. Milek J., *The activation energies and optimum temperatures of olive oil hydrolysis by lipase porcine pancreas*, Ecological Chemistry and Engineering. S, 28(3), 2021, s. 389-398, DOI: 10.2478/eces-2021-0026.
12. Wei N., Xu R., Tang R., *Immobilization of horseradish peroxidase on modified electrospun nanofibrous membrane for 2,4-dichlorophenol removal*, 2th International Conference on Materials Chemistry and Environmental Protection Sanya City, China, 23-25 November 2018, s. 283-292, <https://www.scitepress.org/Papers/2018/81889/81889.pdf> [data dostępu: 10.08.2022].
13. Malomo S.O., Adeoye R.I., Babatunde L., Saheed I.A., Iniaghe M.O., Olorunniji F.J., *Suicide inactivation of horseradish peroxidase by excess hydrogen peroxide. The effects of reaction pH, buffer ion concentration, and redox mediation*, Biokemistri, 23(3), 2011, s. 124-128, <https://www.ajol.info/index.php/biokem/article/view/77688> [data dostępu 10.08.2022].
14. Milek J., *Determination the optimum temperatures and activation energies of inulin hydrolysis by endo-inulinase Aspergillus niger*, Chemical and Process Engineering, 41(3), 2020, s. 229-236, DOI: 10.24425/CPE.2020.132545.
15. Milek J., *Thermodynamics and kinetics of thermal deactivation of catalase Aspergillus niger*, Polish Journal of Chemical Technology, 22(2), 2020, s. 67-72, DOI: 10.2478/pjct-2020-0018.
16. Milek J., *Determination of activation energies and the optimum temperatures of starch hydrolysis by α -amylase from porcine pancreas*, Molecules, 26(14), 2021, s. 4117, DOI: 10.3390/molecules26144117.
17. Milek J., *The inulin hydrolysis by recombinant exo-inulinase. Determination the optimum temperatures and activation energies*, Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 147, 2022, s. 8061-8067, DOI: 10.1007/s10973-021-11086-6.
18. Milek J., *Application of the new method to determine the activation energies and optimum temperatures of inulin hydrolysis by exo-inulinases Aspergillus niger*, Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 147, 2022, s. 1371-1377, DOI: 10.1007/s10973-020-10495-3.
19. Milek J., *The energies of activation and deactivation of 2,4-dichlorophenol degradation by horseradish peroxidase immobilized on the modified nanofibrous membrane*, XVI-letnia Szkoła Membranowa, Membrany i procesy membranowe w teorii i praktyce, Szczecin, 20-22 lipca 2022, https://membrany2022.zut.edu.pl/?id=15012&no_cache=1 [data dostępu: 9.09.2022].
20. Onaizi S.A., *Statistical analyses of the effect of rhamnolipid biosurfactant addition on the enzymatic removal of Bisphenol A from wastewater*, Biocatalysis Agriculture Biotechnology, 32, 2021, s. 101929, DOI:10.1016/j. bcab.2021.101929.
21. Hewson W.D., Dunford H.B., *Horseradish peroxidase. XVIII. The Arrhenius activation energy for the formation of compound I*, Canadian Journal of Chemistry, 53, 1975, s. 1928-1932, DOI: 10.1139/v75-268.

22. Abdulaal W.H., Almulaiky Y.Q., El-Shishtawy R.M., *Encapsulation of HRP enzyme onto a magnetic Fe_3O_4 Np-PMMA film via casting with sustainable biocatalytic activity*, Catalysts, 10, 2020, s. 181, DOI:10.3390/catal10020181.
23. Grubecki I., *Optimal feed temperature for hydrogen peroxide decomposition process occurring in a bioreactor with fixed-bed of commercial catalase. A case study on thermal deactivation of the enzyme*, Chemical and Process Engineering, 39(4), 2018, s. 491-501, DOI: 10.24425/cpe.2018.124974.
24. Miłek J., Wójcik M., Verschelde W., *Thermal stability for the effective use of commercial catalase*, Polish Journal of Chemical Technology, 16, 2014, s. 75-79, DOI: 10.2478/pjct-2014-0073.

Metoda wyznaczania energii aktywacji i dezaktywacji bioprocusów z zastosowaniem immobilizowanych enzymów

Streszczenie

W pracy przedstawiono znaczenie energii aktywacji i dezaktywacji oraz optymalnych temperatur fenolu usuwanego przez peroksydazę chrzanową (HRP). Przeanalizowano krzywe aktywności peroksydazy chrzanowej w funkcji temperatury. W modelu matematycznym opisującym peroksydazę chrzanową założono, że zarówno usuwany fenol, jak i dezaktywacja peroksydazy chrzanowej były reakcjami I rzędu ze względu na stężenie enzymu. Dla peroksydazy chrzanowej unieruchomionej odpowiednio na membranie kopolimeru akrylonitrylowego i nanowłóknach poli(alkoholu winylowego)-poliakryloamidu (PVA-PAAm) wyznaczone optymalne temperatury T_{opt} wynosiły odpowiednio $305,18 \text{ K} \pm 1,32 \text{ K}$ i $324,38 \text{ K} \pm 1,22 \text{ K}$, energie aktywacji E_r wyniosły odpowiednio $42,05 \text{ kJ/mol} \pm 9,27 \text{ kJ/mol}$ i $41,14 \text{ kJ/mol} \pm 25,80 \text{ kJ/mol}$, a energie dezaktywacji E_d wyniosły odpowiednio $52,85 \text{ kJ/mol} \pm 7,42 \text{ kJ/mol}$ i $197,61 \text{ kJ/mol} \pm 52,38 \text{ kJ/mol}$. Otrzymane wyniki mogą znaleźć zastosowanie w projektowaniu oraz modelowaniu procesu, w którym usuwany jest fenol.

Słowa kluczowe: peroksydaza chrzanowa, fenol, membrana z kopolimeru akrylonitrylu, nanowłókna PVA-PAAm, energie aktywacji i dezaktywacji

The methods of determination energies of activation and deactivation in bioprocess with using enzymatic membrane

Abstract

The present paper presents the estimation of the activation and deactivation energies and the optimum temperatures of phenol removed by horseradish peroxidase (HRP). The activity horseradish peroxidase vs. temperature curves was analyzed. In a mathematical model describing the horseradish peroxidase, the activity was assumed that both the phenol removed and the deactivation of horseradish peroxidase were first-order reactions by the enzyme concentration. Determining optimum temperatures T_{opt} were $305,18 \pm 1,32 \text{ K}$ and $324,38 \pm 1,22 \text{ K}$, activation energies E_r were $42,05 \pm 9,27 \text{ kJ/mol}$ and $41,14 \pm 25,80 \text{ kJ/mol}$, and the deactivation energies E_d were $52,85 \pm 7,42 \text{ kJ/mol}$ and $197,61 \pm 52,38 \text{ kJ/mol}$ for horseradish peroxidase immobilized on the acrylonitrilecopolymer membrane and the poly(vinyl alcohol)-polyacrylamide (PVA-PAAm) nanofibrous, respectively. The present study is related to the phenol removed by horseradish peroxidase. The obtained results might find application in the design and modeling in phenol removed.

Keywords: horseradish peroxidase, phenol, acrylonitrile copolymer membrane, PVA-PAAm nanofibrous, activation and deactivation energies

Analiza profili białkowych u pacjentów poddanych terapii cyklosporyną A z zastosowaniem spektrometrii mas

1. Wprowadzenie

1.1. Cyklosporyna A i jej aktywność biologiczna

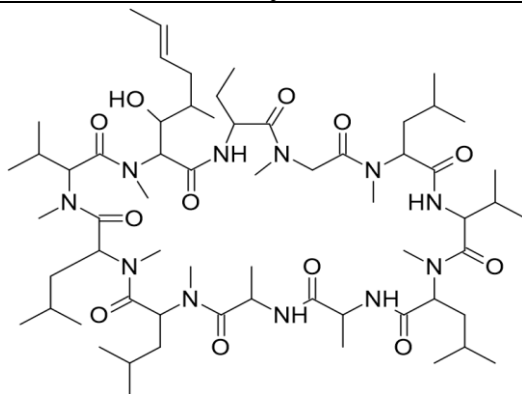
Cyklosporyna A (CsA) to lek immunosupresyjny powszechnie stosowany w transplantacji narządów, działający m.in. poprzez blokowanie transkrypcji genów cytokin w aktywowanych limfocytach T [1]. Jego zastosowanie spowodowało zwiększenie przeżywalności zarówno pacjentów, jak i przeszczepów od czasu wprowadzenia na rynek we wczesnych latach 80. – poprzez zmniejszenie częstości występowania choroby przeszczep przeciw gospodarzowi (ang. GVHD, *graft-versus-host disease*) [2]. Immunosupresyjne działanie pozwala na zastosowanie CsA również w ramach leczenia chorób o podłożu autoimmunologicznym, jak łuszczyca, atopowe zapalenie skóry czy reumatoidalne zapalenie stawów [3]. Mimo szerokiego zastosowania w medycynie – cyklosporyna A wykazuje znaczną toksyczność, jednak uznaje się, że korzyści płynące z jej stosowania są nadrzędne, a negatywne skutki zdrowotne pozostają nieuniknioną ewentualnością [4].

CsA to lipofilny, cykliczny peptyd o masie 1202 Da (rys. 1), który został po raz pierwszy wyizolowany z patogennego dla owadów grzyba *Toxopneustes inflatus* [5]. Składa się z 11 aminokwasów (undekapeptyd), z czego 1 posiada rzadko spotykaną w organizmach żywych konfigurację D [4]. CsA charakteryzuje obecność 7 N-metylowanych wiązań peptydowych, co jest również wyjątkiem wśród biologicznie aktywnych produktów naturalnych [4]. Zarówno N-metylacja wiązań peptydowych, jak i cykliczność peptydu wpływają na jego właściwości farmakokinetyczne, w tym na stabilność metaboliczną. Z tych względów cyklosporyna A podana doustnie jest aktywna biologicznie oraz wysoce biodostępna, ponieważ nie ulega hydrolizie enzymatycznej w przewodzie pokarmowym.

W osoczu CsA w 90% wiąże się z białkami, głównie z lipoproteinami, a także z albuminami i globulinami, jest również obecna w erytrocytach [1]. Wchłanianie jelitowe CsA jest zmienna międzypersonalnie, jednak znaczny wpływ mają na nią współistniejące choroby takie jak cukrzyca, problemy z motoryką żołądka i biegunki. Metabolizm jest głównie wątrobowy, z okresem półtrwania wynoszącym 6-9 godzin. Mniej niż 1% CsA jest wydalane z moczem lub kałem [1]. Po metabolizmie przez układ cytochromu P450 metabolity CsA są eliminowane z żółcią, a mniej niż 5% jest wydalane z moczem [1].

¹ tretowicz.maria@gmail.com, Zespół Inżynierii Peptydów, Wydział Chemii, Uniwersytet Wrocławski, <https://uwr.edu.pl/>.

² remigiusz.bachor@chem.uni.wroc.pl, Zespół Inżynierii Peptydów, Wydział Chemii, Uniwersytet Wrocławski, <https://uwr.edu.pl/>.



Rysunek 1. Wzór chemiczny cyklosporyny A [opracowanie własne]

CsA w komórkach wiąże się z cyklofiliną A, cytoplazmatycznym białkiem o aktywności izomerazy. Inhibicja cyklofiliny powoduje hamowanie kalcyneuryny, białkowego enzymu o aktywności fosfatazy białkowej, fosforylującej reszty treoninowe albo serynowe białek (fosfataza białkowa serynowo-treoninowa). Działanie kalcyneuryny jest regulowane przez jony wapnia i kalmodulinę (białko regulatorowe). Aktywowanie kalcyneuryny powoduje defosforylację miejsc regulatorowych kilku czynników transkrypcyjnych, w szczególności czynnika jądrowego aktywowanych limfocytów T (NFAT, ang. *nuclear factor of activated T-lymphocytes*). Hamowanie kalcyneuryny zapobiega defosforylacji NFAT i jego późniejszej translokacji z cytoplazmy do jądra, co powoduje brak aktywacji limfocytów T i produkcji cytokin oraz obniża ogólny poziom odpowiedzi immunologicznej [1]. Niestety, pomimo licznych zalet, CsA wykazuje także działania niepożądane.

1.2. Nefrotoksyczność CsA

Interakcje CsA z innymi białkami poza cyklofiliną A, jej celem molekularnym, są zaangażowane w aktywację szlaków sygnałowych, które prowadzą do licznych skutków ubocznych, w tym nefrotoksyczności, hepatotoksyczności i kardiotoxyczności, a mechanizm ich działania pozostaje niejasny. Uważa się, że niepożądane objawy są częściowo spowodowane hamowaniem kalcyneuryny w tkankach, jak również zaburzeniem homeostazy jonów.

Wyróżnia się 2 rodzaje nefrotoksyczności CsA: ostrą nefrotoksyczność spowodowaną dysfunkcją naczyń oraz bardziej przewlekłą formę w postaci zwłóknienia [1]. Podłożem ostrych zmian jest m.in. aktywacja układu renina–angiotensyna–aldosteron, zwiększenie czynników zwężających naczynia, jak endotelina czy tromboksan, a także redukcja czynników rozszerzających naczynia, jak prostacykliny, prostaglandyny E2 i tlenek azotu(II) (NO). Przewlekła nefrotoksyczność CsA charakteryzuje się zwykle atrofią kanalików, napływem komórek zapalnych, pasiastym zwłóknieniem kanalików śródmiąższowych, arteriolopatią i zwiększoną immunogennością wewnątrznerkową [6, 7]. Sugeruje się, że CsA może również uszkadzać komórki kanalików nerkowych przez mechanizmy pośrednie, a mianowicie poprzez indukowanie produkcji osteopontyny, która promuje stan zapalny uszkadzający komórki nerkowe [7]. Nefrotoksyczność CsA może hamować syntezę DNA i zwiększać tempo apoptozy komórek kanalikowych w nerkach w sposób zależny od dawki i czasu [7, 8]. Badania donoszą, że długotrwała terapia CsA powoduje nefrotoksyczność u ponad 30% pacjentów, zwłaszcza u osób po przeszczepie [7, 9].

Wiadomo także, że cyklosporyna A wykazuje toksyczny synergizm m.in. z aminoglikozydami i amfoterycyną B, czego efektem może być ostra martwica kanalików, chociaż dysfunkcja ta pojawia się również u pacjentów poddanych monoterapii [7].

Możliwość przewidzenia niepożądanych skutków farmakoterapii, takich jak nefrotoksyczność CsA, poprzez wykrycie charakterystycznych zmian w moczu czy krwi jest ważna, ponieważ zidentyfikowanie stanu chorobowego na wczesnym etapie pomoże zminimalizować ryzyko uszkodzenia nerek, które może stać się nieodwracalne, jeśli dawka CsA nie zostanie zmniejszona lub terapia nie zostanie zatrzymana i zastąpiona alternatywną w odpowiednim czasie.

1.3. Badanie proteomu krwi

Wśród dostępnych materiałów biologicznych badaniom diagnostycznym podlegają głównie krew (w tym surowica) i mocz, ponieważ są one łatwe do pobrania od pacjentów. W przypadku badań proteomicznych dotyczących niewydolności nerek obserwowano tendencję do stosowania moczu jako materiału biologicznego np. ze względu na możliwość szybkiego stwierdzenia albuminurii. W przypadku terapii CsA okno terapeutyczne jest wąskie i zmienne, a stężenie CsA we krwi jest mało pomocne w przewidywaniu rozwoju uszkodzenia nerek, co również sugerowałoby wykorzystanie moczu jako potencjalnego materiału badawczego [10]. Badania krwi w przypadku pacjentów po transplantacji stosowane są do oceny ogólnego stanu zdrowia. Nefrotoksyczność wywołana CsA rozpoznawana jest zwykle dopiero w momencie wzrostu stężenia kreatyniny w surowicy, oznaczającego znaczne upośledzenie wskaźnika filtracji kłębuszkowej (GFR) [10]. Dodatkowym powodem preferencji moczu jako materiału do badań jest możliwość pomiaru stężenia cząsteczki-1 uszkodzenia nerek (KIM-1), jak i lipokaliny neutrofilowej związanej z żelatynazą (NGAL), które od niedawna są stosowane jako biomarkery uszkodzenia nerek [11]. Zmienność proteomu na skutek nefrotoksyczności indukowanej przez CsA do tej pory nie została zbadana na próbkach krwi ludzi.

Krew w organizmie przechodzi przez wszystkie narządy i tkanki, będąc transporterem białek w całym ustroju. Białka we krwi występują fizjologicznie w dużym stężeniu, głównie ze względu na obecność 22 najczęściej występujących białek HAP (ang. *high abundance proteins*), które stanowią 99% wszystkich obecnych [12]. W surowicy są to m.in. albuminy, haptoglobiny, immunoglobuliny i transferyny, w osoczu także fibrynogen, a w krwi pełnej również białkowe elementy morfotyczne takie jak hemoglobina. Pozostałe 1% to białka/peptydy o masie cząsteczkowej mniejszej niż 10 000 Da, które łącznie, analogicznie do proteomu, mogą być nazywane peptydomem. Do białek naturalnie występujących w małym stężeniu, tzw. LAP (ang. *low abundance proteins*), należą enzymy, cytokiny, hormony białkowe, białka „krążące” (ang. *circulating proteins*), czynniki wzrostu i inne, również pochodzenia patologicznego [13]. Białka o wysokiej masie cząsteczkowej dostają się do krwiobiegu w stanie nienaruszonym wtedy, gdy są aktywnie wydzielane lub gdy ściana naczyniowa staje się przepuszczalna z powodu choroby. Ich degradacja może jednak generować fragmenty wystarczająco małe, aby dostać się do krwi w sposób pasywny, tworząc ślady diagnostyczne [14]. Będą one zasilaly frakcję LAP, do której zaliczane będą również inne białka niefizjologiczne, np. leki o strukturze białka lub białka uwalniane przez bakterie w momencie infekcji. Ten region proteomu krwi, będący mieszaniną małych, nienaruszonych białek i fragmentów dużych białek, reprezentuje wszystkie ich klasy oraz stanowi cenne, do tej pory niewykorzystane, źródło informacji.

1.4. Zmienność proteomu ze względu na terapię CsA

Istnieją różne mechanizmy, poprzez które CsA powoduje nefrotoksyczność, a ich wspólnym mianownikiem jest zmiana stężenia białek występujących fizjologicznie lub lokalna obecność нефizjologicznych białek pojawiających się na skutek apoptozy komórek lub ich włóknienia. W tabeli 1 zebrano najważniejsze badania na temat zmienności proteomu jako efektu nefrotoksyczności CsA.

Tabela 1. Porównanie najważniejszych badań dotyczących zmienności proteomu spowodowanej nefrotoksycznością CsA

Badanie	Materiał badawczy	Metoda	Zmienność proteomu
Z. Shu i wsp. (2009) [2]	osocze szczurów Wistar	<i>bottom-up</i> : 2D-PAGE, MALDI-TOF, ESI-qTOF	indukcja: α -1-kwaśna glikoproteina (AAG), klasteryna (CLUS), inhibicja: haptoglobina (Hp)
F. Lamoureux i wsp. (2011) [15]	ludzkie embrionalne komórki nerek (HEK-293)	SILAC, MALDI-TOF/TOF	zmiana stężenia 69 fizjologicznych białek
K. Kędzierska i wsp. (2014) [16]	tkanka nerki szczurów Wistar	<i>bottom-up</i> : 2D-PAGE, MALDI-TOF	zmiana stężenia 5 fizjologicznych białek
M. Puigmule i wsp. (2009) [17]	mysie proksymalne komórki nerkowe (PCT3), ludzkie komórki nabłonka kanalików proksymalnych (HK-2)	<i>bottom-up</i> : 2D-PAGE, MALDI-TOF/TOF	zmiana stężenia 38 fizjologicznych białek
C.P. Carlos i wsp. (2014) [10]	mocz szczurów Munich-Wistar	test immunoenzymatyczny (ELISA)	indukcja: cząsteczka-1 uszkodzenia nerek (KIM-1), czynnik martwicy nowotworów (TNF- α), fibronektyna, osteopontyna, transformujący czynnik wzrostu beta (TGF- β)

Źródło: opracowanie własne.

Do porównania nie zostało włączone potencjalnie istotne badanie L. Carreras-Planella i wsp., które polegało na proteomicznej analizie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w moczu [18]. Badanie obejmowało wpływ inhibitorów kalcyneuryny, takich jak CsA i takrolimus, na proteom, niemniej próba stosująca CsA była mało reprezentatywna.

W 3 z 5 badań zmienność proteomu polegała na zmianie stężenia białek fizjologicznych. Należy zauważyć, że do tej grupy zaliczane są także białka, które mogą pojawić się jako reakcja na uszkodzenie, a więc być efektem np. procesu włóknienia, choć nie

może być to stwierdzone jednoznacznie [14]. W badaniach zmiana stężenia białek nie jest określana na podstawie analizy ilościowej – poza badaniem F. Lamoureux i wsp., gdzie użyto znakowania trwałymi izotopami (SILAC, ang. *stable isotope labeling by amino acids*) – a na podstawie analizy statystycznej [15].

Z porównania wynika, że przeprowadzone do tej pory badania proteomiczne opierały się głównie na modelu szczurzym lub hodowanych liniach komórkowych [19]. Zaletą takich badań jest szybkie odtworzenie nefrotoksyczności CsA w sposób zależny od dawki i czasu. Pozwalają one zbadać mechanizmy nefrotoksyczności przy udziale skończonej liczby czynników zmiennych, ale mają na celu wyłącznie sygnalizowanie kierunku zmienności proteomu u ludzi. Są to badania modelowe, których wyniki należałoby poddać dalszej weryfikacji.

Zmienność proteomu oznaczona w przytoczonych badaniach jest zróżnicowana, na co wpływ z pewnością ma wybór materiału badawczego. Zauważalny jest brak badań na próbkach moczu czy krwi u ludzi, a najbliższy ich odpowiednik stanowi praca Z. Shu i wsp. [2].

1.5. Wykorzystanie spektrometrii mas do analizy proteomu

Spektrometria mas znajduje zastosowanie w większości badań proteomicznych ze względu na możliwość precyzyjnego pomiaru stosunku masy do ładunku jonu peptydu (m/z). Spośród różnych dostępnych źródeł jonów tylko jonizacja przez elektrorozpylanie (ESI, ang. *electrospray ionization*) i desorpcja/jonizacja laserowa wspomagana matrycą (MALDI, ang. *matrix-assisted laser desorption/ionization*) efektywnie wytwarzają jony peptydów i białek w fazie gazowej, umożliwiając analizę proteomiczną [20]. Spektrometry masowe często połączone są z układami chromatograficznymi umożliwiającymi dodatkowy rozdział w zależności od czasu retencji, a w zasadzie od budowy i właściwości analizowanych związków.

Aby uzyskać informację o sekwencji aminokwasowej peptydów powstałych po proteolizie, należy przeprowadzić eksperyment z wykorzystaniem tandemowej spektrometrii mas. Polega ona na wybraniu z widma masowego (MS) jonów macierzystych i poddaniu ich fragmentacji w komorze kolizyjnej, a następnie na wykryciu jonów potomnych w kolejnym analizatorze w czasie trwania eksperymentu, co jest obrazowane na widmie fragmentacyjnym (MS/MS lub MS^2) [21]. Uzyskane widma stanowią podstawę do identyfikacji białek w próbce.

Spektrometria mas jest konkurencyjna w porównaniu do innych technik badania białek, np. elektroforezy, ze względu na jej zdolność do radzenia sobie ze złożonością proteomu [20]. Do innych zalet spektrometrii mas, w zależności od dostępnej aparatury, należy wysoka rozdzielczość, dokładność oraz czułość, a także możliwość detekcji w szerokim zakresie mas analitów.

2. Cel pracy

Celem niniejszej pracy było określenie możliwości zastosowania spektrometrii mas w identyfikacji białek w próbkach hydrolizatów tryptycznych krwi pełnej – związanych ze stanami patologicznymi nerek – u pacjentów w trakcie podtrzymującej terapii cyklosporyną A. Nasze badania miały na celu zobrazowanie potencjalnej nadekspresji wybranych białek mogących pełnić rolę biomarkerów molekularnych, co w przyszłości mogłoby przyczynić się do opracowania metod wcześniejszej diagnostyki nefrotoksyczności w terapii cyklosporyną A.

3. Analiza proteomiczna

Badania polegały na analizie proteomicznej profili białkowych krwi u pacjentów poddanych terapii immunosupresyjnej cyklosporyną A z zastosowaniem metody LC-MS/MS.

3.1. Materiały i metody

Wodorowęglan trietyloamoniowy (TEAB), ditiotreitrol (DTT), jodoacetamid oraz tripsyna pochodziły z firmy Sigma-Aldrich. Rozpuszczalniki do przygotowania próbek i analizy LC-MS zostały zakupione w firmie JTBaker's. RapiGest SF pochodził z firmy Waters. Do przygotowania roztworów używano rozpuszczalników o stopniu czystości 95% do syntezy organicznej lub $\geq 99,9\%$ czystości LC-MS.

3.2. Materiał biologiczny

Materiałem biologicznym poddanym analizie proteomicznej były próbki krwi pełnej, które zostały pobrane od 8 pacjentów w trakcie rutynowego oznaczania stężenia CsA w krwi w dniach 3 oraz 4 marca 2022 r. Krew została pobrana do probówek z dodatkiem środka zapobiegającego krzepnięciu (EDTA). Pacjenci to osoby po transplantacji narządów mięszowych w trakcie podtrzymującej terapii immunosupresyjnej CsA. Pacjenci zażywali CsA w postaci dopuszczonego do obrotu produktu leczniczego o nazwie *Equoral* doustnie (roztwór doustny zamknięty w kapsułkach, 25 mg) w dawce 25 mg/d. W tabeli 2 zestawiono płeć, stężenie CsA [ng/ml] oraz stosowany lek i dawkę dzienną. Oznaczone stężenie CsA wynosi średnio $119,2 \pm 20,9$ ng/ml, po odrzuceniu skrajnych wyników $119,8 \pm 5,3$ ng/ml. W karcie charakterystyki produktu leczniczego *Equoral* znajduje się informacja o możliwych działaniach niepożądanych, w tym bardzo częstym występowaniu zaburzeń czynności nerek, które są częstsze i zwykle bardziej nasilone u pacjentów po zabiegach transplantacji i długotrwałym leczeniu podtrzymującym [22].

Tabela 2. Zestawienie płci, stężenia CsA [ng/ml] oraz stosowanego leku i dawki dziennej

Oznaczenie pacjenta	Płeć	Stężenie CsA [ng/ml]	Lek (dawka dzienna)
1	M	119,1	Equoral (25 mg)
2	K	155,5	
3	K	121,7	
4	M	109,9	
5	M	125,6	
6	K	120,5	
7	K	79,3	
8	M	122,1	

Źródło: opracowanie własne.

Pobranie krwi oraz jej przygotowanie do badań metodą LC-MS/MS zostało wykonane przez wykwalifikowany personel medyczny w Uniwersyteckim Szpitalu Klinicznym we Wrocławiu (Katedra i Klinika Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu). Pacjenci wyrazili pisemną zgodę na uczestnictwo w badaniu zgodnie z Deklaracją Helsińską. Próbkę krwi do badań zostały

pobrane równolegle z próbkami do innych badań klinicznych bez obciążania pacjentów dodatkowymi procedurami. Procedura pobierania próbek przeprowadzona została zgodnie z zasadami GCP (Dobrej Praktyki Klinicznej) Deklaracji Helsińskiej. Badanie zostanie zatwierdzone przez Lokalną Komisję Etyczną. W badaniu wzięli udział wyłącznie polscy pacjenci. W badanej grupie nie było pacjentów szczególnie wrażliwych. W grupie badanej nie było osób nieletnich. Wszystkie pobrane próbki zostały zanonimizowane. Wszystkie były zbierane zgodnie z przepisami RODO.

3.3. Przygotowanie próbek

Próbkę pełnej krwi (100 µl) rozcieńczono do 500 µl 0,1 M roztworem TEAB z dodatkiem 1% surfaktantu RapiGest SF i umieszczono w łaźni ultradźwiękowej na 15 minut. Do tak uzyskanej próbki dodano 100 µl 0,1 M wodnego roztworu DTT i inkubowano temperaturze 95°C przez 5 minut w celu redukcji mostków disulfidowych. Do mieszaniny dodano 100 µl 0,2M wodnego roztworu jodoacetamidu w celu zablokowania grup sulfhydrylowych powstałych po redukcji DTT. Próbkę inkubowano próbkę przez 40 minut w temperaturze pokojowej w ciemności. Do tak otrzymanej mieszaniny dodano 50 µl roztworu trypsyny (1 mg/ml enzymu w 0,1M roztworze TEAB + 0,1% RapiGest) po czym inkubowano w temperaturze 37°C przez 24h. Reakcję zakończono przez zakwaszenie kwasem mrówkowym. Uzyskaną próbkę poddano liofilizacji, a suchą pozostałość użyto w analizie LC-MS.

Pomiary LC-MS/MS zostały wykonane na spektrometrze mas typu LCMS IT-TOF firmy Shimadzu wyposażonym w układ HPLC Nexera XR LC-20AD z autosamplerem SIL-20AC. Zastosowane zostały następujące parametry do pomiarów: zakres pomiarów: 150-2000 m/z, gaz suszący: azot (przepływ 8 l/min), gaz rozpylający: azot (przepływ 2 l/min), napięcie na detektorze 1,67 kV. Próbkę do analizy LC-MS rozpuszczono w mieszaninie H₂O/MeCN/HCOOH (85:15:0,1, v:v:v). Pomiary przeprowadzono w trybie jonów dodatnich. Pomiary LC-MS/MS przeprowadzone zostały przy użyciu kolumny Aeris Peptide XB-C18 o wymiarach 100 mm × 2,1 mm i średnicy ziaren 3,6 µm. Zastosowany gradient 15-80% B w A (A = 0,1% HCOOH w wodzie, B = 0,1% HCOOH w MeCN) w 45 minut. Szybkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 0,2 ml/min. Objętość nastrzyku wynosiła 5 µl. Uzyskane dane eksperymentalne poddano analizie bioinformatycznej przy pomocy programu PEAKS.

4. Wyniki i dyskusja

Włączając się w nurt współczesnej proteomiki do celów diagnostyki medycznej postanowiliśmy zastosować podstawowe narzędzie badań proteomicznych, jakim jest tandemowa spektrometria mas sprzężona z wysokosprawną chromatografią cieczową, w poszukiwaniu obecności białek znanych z literatury naukowej jako potencjalnych biomarkerów dysfunkcji nerek. Praca na pełnej krwi, choć złożona i wymagająca, stała się punktem wyjścia do optymalizacji metody badawczej, jak i sprawdzenia rozwiązań związanych z frakcjonowaniem białek czy selektywnym usuwaniem wybranych składników, w celu zmniejszenia stopnia złożoności badanego materiału. W prowadzonych przez nas badaniach sprawdziliśmy możliwość zastosowania kolumn umożliwiających odseparowanie albuminy (Multiple Affinity Removal Spin Cartridge HSA/IgG, Waters). Ich użycie na pełnej krwi nie przyniosło jednak rezultatu związanego ze zmniejszeniem

stopnia złożoności próbki, lecz doprowadziło do wyeliminowania dużej ilości możliwych do analizy składników. W związku z tym dalsze badania prowadzone były na pełnej krwi.

Próbkę pełnej krwi potraktowano standardową procedurą proteomiczną prowadzącą do uzyskania hydrolizatu, obejmującą redukcję mostków disulfidowych, blokowanie utworzonych grup tiolowych w celu ich zabezpieczenia przed spontanicznym utlenieniem oraz hydrolizę enzymatyczną przy udziale trypsyny, co dokładnie przedstawiono w sekcji *Materiały i metody*. Uzyskaną po liofilizacji suchą pozostałość rozpuszczono w mieszaninie H₂O/MeCN/HCOOH (85:15:0,1, v:v:v) i poddano analizie LC-MS/MS. Łącznie analizie poddano 8 próbek pochodzących od pacjentów poddanych terapii cyklosporyną A po transplantacjach. Każdą próbkę analizowano trzykrotnie. W niniejszym opisie wyników uwzględniono opis białek, których obecność może wskazywać na dysfunkcję nerek, i które zostały wykazane w dotychczasowej literaturze naukowej.

Analiza bioinformatyczna danych uzyskanych z pomiarów LC-MS/MS została przeprowadzona przy udziale programu PEAKS, z założeniem dopuszczalnych modyfikacji potranslacyjnych w postaci karbamidometylacji reszty cysteiny, oksydacji metioniny oraz deamidacji asparaginy i glutaminy. Identyfikacja białka przeprowadzona została na podstawie co najmniej dwóch unikatowych sekwencji peptydowych.

Wśród zidentyfikowanych, interesujących przykładów białek znajduje się białko AHNAK2, nukleoproteina należąca do rodziny białek AHNAK, zidentyfikowana w próbkach nr 2, 3, 5, 6, 8. Niedawno pojawiały się doniesienia literaturowe sugerujące, że białko to może stanowić biomarker chorób nerek, w tym nowy marker prognostyczny i białko onkogenne raka nerkowokomórkowego, jak i trzustki [23,24]. Kolejnym przykładem zidentyfikowanego białka jest enwoplakina (próbka nr 3), która wraz z periplakiną są dwoma najmniejszymi białkami łącznikowymi cytoszkieletu z rodziny plakin. Ich rolą jest łączenie włókien pośrednich ze złączami komórkowymi i innymi lokalizacjami w błonie. Plakiny odgrywają strukturalną rolę w tworzeniu zrogowaciałej otoczki (CE), końcowej fazie różnicowania naskórka. Obecność enwoplakiny w próbkach krwi i moczu została także powiązana z chorobami nerek oraz niektórymi chorobami autoimmunizacyjnymi [25].

Następnym z interesujących przykładów białka zidentyfikowanego w próbkach jest α 1-antytrypsyna (próbki nr 1, 2, 3, 4, 7, 8), będąca białkiem stresu wątrobowego o działaniu inhibitora proteazy. Ostatnie dowody wskazują, że uszkodzenie niedokrwienne lub toksyczne może wywołać selektywne zmiany w nerkach, które przypominają fenotyp wątroby [26].

Wśród zidentyfikowanych białek znaleźć można także czynniki prognostyczne dla raka nerkowokomórkowego, do których należą N-metylotransferaza histonowo-lizynowa (próbki nr 2, 3, 5) oraz białko Piwi (próbka nr 2). Identyfikacji białka Piwi dokonano wielokrotnie w przypadku pacjentów z różnorodnymi chorobami nowotworowymi, jak również jego obecność powiązano z chorobami nerek [27]. N-metylotransferaza histonowo-lizynowa specyficznie monometyluje określoną resztę lizyny histonu H3, tworząc w ten sposób swoisty znacznik epigenetycznej aktywacji transkrypcyjnej. Uważa się, że metylacja reszt lizyny w N-końcowych ogonach histonów stanowi ważny element mechanizmu regulującego strukturę chromatyny. Ostatnie badania wykazały, że ekspresja i aktywność tego enzymu są również zwiększone w kilku zwierzęcych modelach uszkodzenia nerek, takich jak ostre uszkodzenie nerek, zwłóknienie nerek, nefropatia cukrzycowa, toczniowe zapalenie nerek i odrzucenie przeszczepu nerki [28].

Zespół Bardeta-Biedla, stanowiącego chorobę autosomalną recesywną, powodowaną homozygotyczną mutacją, prowadzącą do dysfunkcji 8 różnych białek, wiąże się także z nieprawidłowościami w funkcjonowaniu nerek [29]. Wyniki naszych badań wskazują na możliwość identyfikacji w badanych próbkach tryptycznych hydrolizatów obecności białka Bardeta-Biedla (próbki nr 5, 6), które może powodować zmiany morfologiczne i molekularne w nerkach, zaburzając wiele układów istotnych dla fizjologii nerek i kontroli ciśnienia krwi [29].

Jednym ze zidentyfikowanych białek była fetuina-A (próbka nr 7), stanowiąca nowo odkryty marker upośledzenia czynności nerek u pacjentów z cukrzycą typu 2 [30]. Jest to glikoproteina, która jest syntetyzowana w wątrobie i wydzielana do krwiobiegu. Należy do dużej grupy białek wiążących, które pośredniczą w transporcie i umożliwiają dostępność szerokiej gamy substancji w krwiobiegu. Badania wykazały, że fetuina-A może działać jako ochronny inhibitor zwężenia naczyń u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek i schyłkową niewydolnością nerek. Niedobór tego białka wiąże się ze wzrostem zachorowalności i śmiertelności pacjentów z chorobami układu krążenia. Fetuina-A może być użyteczna jako marker choroby naczyniowej u pacjentów z cukrzycą typu 2. W rzeczywistości jest niezależnym predyktorem cukrzycy typu 2.

Przeprowadzone badania pozwoliły na zestawienie rodzaju zidentyfikowanych białek oraz częstości ich identyfikacji w tym badaniu (ilość próbek z obecnym białkiem na całkowitą liczbę próbek) w tabeli 3. Wyniki uzyskane w efekcie trzykrotnej analizy jednej próbki nie wykazywały różnic. Ze względu na wstępny charakter badań na tym etapie niemożliwe jest wykazanie bezpośredniej zależności między zidentyfikowanymi białkami a zaburzeniem pracy nerek na skutek podtrzymującej terapii CsA, a wyróżnione białka w roli potencjalnych biomarkerów mają stanowić jedynie potencjalny punkt wyjściowy dla przyszłych badań w tej dziedzinie. Biorąc pod uwagę wstępny charakter badań oraz wąską próbę badawczą statystyczna analiza wyników nie została wykonana.

Tabela 3. Zestawienie płci, stężenia CsA [ng/ml] oraz objawów sugerujących zaburzoną pracę nerek pacjentów, których krew poddano badaniu

Zidentyfikowane białko	Nr próbek	Częstość identyfikacji
AHNAK2	2, 3, 5, 6, 8	5/8
enwoplakina	3	1/8
α 1-antytrypsyna	1, 2, 3, 4, 7, 8	6/8
N-metylotransferaza histonowo-lizynowa	2, 3, 5	3/8
białko Piwi	2	1/8
białko Bardeta-Biedla	5, 6	2/8
fetuina-A	7	1/8

Z uzyskanych danych wyłania się interesujący przekrój białek powiązanych z dysfunkcjami nerek, które powinny być poddane szerzej zakrojonym badaniom, potwierdzających ich wykorzystanie jako biomarkerów molekularnych. Ich identyfikacja na wczesnym, bezobjawowym etapie choroby mogłaby doprowadzić do wczesnej diagnozy, a co za tym idzie modyfikacji terapii poprzez dostosowanie dawki CsA lub zmiany leku immunosupresyjnego. Niestety, podstawowym problemem przy badaniach złożonych układów

biologicznych, jest często zbyt niska czułość analizy uniemożliwiająca identyfikację niektórych białek w analizowanej próbce, w tym tych stanowiących biomarkery molekularne różnych chorób, które na bezobjawowym etapie choroby mogą występować w znikomych ilościach. Proponowanym rozwiązaniem poszerzającym możliwość aplikacji spektrometrii mas w diagnostyce laboratoryjnej jest zastosowanie opracowanych przez autorów niniejszej rozprawy metod chemicznej modyfikacji próbek, polegających na wprowadzaniu do cząsteczek analitu odpowiednich grup chemicznych. Takim przykładem są czwartorzędowe grupy amoniowe zawierające trwały ładunek elektryczny. Ich obecność znacznie zwiększa wydajność jonizacji badanych związków umożliwiając ich ultraczułą detekcję nawet na poziomie attomolowym (10^{-18} mola). Zastosowanie metod zwiększania czułości analizy związków organicznych metodą spektrometrii mas może znaleźć zastosowanie nie tylko w standardowych badaniach, ale także stworzyć zupełnie nowe techniki diagnostyki medycznej umożliwiające wczesną identyfikację zmian chorobowych przez detekcję biomarkerów molekularnych konkretnych stanów patologicznych organizmu.

Proponowanym przez nas rozwiązaniem, zmierzającym w stronę zwiększenia wydajności jonizacji badanych hydrolizatów tryptycznych białek w ich analizie metodą spektrometrii mas jest selektywna modyfikacja ładunkowa grup aminowych łańcucha bocznego reszt lizyny za pomocą znacznika jonizacyjnego w formie tetrafluoroboranu 2,4,6-trifenylopiryliowego. Utworzona w ten sposób sól pirydyniowa nie dość, że generuje trwały ładunek dodatni, to jeszcze utworzony koniugat w warunkach eksperymentu MS/MS prowadzi do powstania jonu reporterowego w postaci protonowanego kationu 2,4,6-trifenylopirydyniowego, co sprawia, że analiza takich pochodnych peptydowych staje się bardziej jednoznaczna, czego potwierdzenie można znaleźć w naszych wcześniejszych pracach [31-33]. Eksperymentalne prace w tym kierunku są nieustannie prowadzone, a ich rezultaty ukażą się niebawem w literaturze naukowej. Ich wartość dla współczesnej diagnostyki medycznej może być znacząca z uwagi na możliwość rozwiązania licznych problemów, wynikających z czułości detekcji, jednoznaczności oznaczeń i wystarczająco wczesnej identyfikacji biomarkerów molekularnych.

5. Podsumowanie i wnioski

Prowadzone przez nas badania nad możliwością identyfikacji potencjalnych biomarkerów molekularnych stanów patologicznych nerek umożliwiły potwierdzenie aplikacyjności techniki LC-MS/MS we wstępnych badaniach proteomicznych próbek pełnej krwi pochodzących od pacjentów poddanych terapii cyklosporyną A. Uzyskane wyniki badań wskazują jednoznacznie na obecność białek związanych z rozwijającymi się lub rozwiniętymi już dysfunkcjami, których potwierdzenie jest nierzadko bardzo trudne, gdy bazuje się wyłącznie na objawach klinicznych czy standardowej diagnostyce medycznej. Potwierdzenie obecności białkowych biomarkerów molekularnych w próbkach biologicznych na bezobjawowym etapie zaburzenia zdrowia może zrewolucjonizować współczesną diagnostykę medyczną, stając się niezwykle cennym narzędziem w rękach diagnostów medycznych, lekarzy czy jednostek szpitalnych. Problem czułości detekcji śladowych ilości białek sygnalizujących dane zaburzenie proponujemy rozwiązać przez zastosowanie w analizowanych hydrolizatach metody derywatyzacji ładunkowej tryptycznych fragmentów białek polegającej na wprowadzeniu grupy tworzącej trwały ładunek, znacznie zwiększający wydajność jonizacji w analizie metodą spektrometrii mas.

Literatura

1. Tedesco D., Haragsim L., *Cyclosporine. A review*, Journal of Transplantation, 2012, s. 1-7.
2. Shu Z., Pu X., Xiong X., Li Q., Wang Y., Zhai S., *Differential expression of plasma proteins in cyclosporine a-induced rat acute nephrotoxicity*, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 73, 2009, s. 592-598.
3. Hu G., Wang K., Groenendyk J., Barakat K., Mizianty M.J., Ruan J., Michalak M., Kurgan L., *Human structural proteome-wide characterization of cyclosporine a targets*, Bioinformatics, 30, 2014, s. 3561-3566.
4. Rezzani R., *Cyclosporine A and adverse effects on organs. Histochemical studies*, Progress in Histochemistry and Cytochemistry, 39, 2004, s. 85-128.
5. Yang X., Feng P., Yin Y., Bushley K., Spatafora J.W., Wang C., *Cyclosporine biosynthesis in Tolypocladium inflatum benefits fungal adaptation to the environment*, mBio, 9, 2018.
6. Chen H.-W., Chien C.-T., Yu S.-L., Lee Y.-T., Chen W.-J., *Cyclosporine A regulate oxidative stress-induced apoptosis in cardiomyocytes. Mechanisms via ROS generation, iNOS and Hsp70*, British Journal of Pharmacology, 137, 2002, s. 771-781.
7. Wu Q., Wang X., Nepovimova E., Wang Y., Yang H., Kuca K., *Mechanism of cyclosporine A nephrotoxicity. Oxidative stress, autophagy, and signalings*, Food and Chemical Toxicology, 118, 2018, s. 889-907.
8. Ortiz A., Lorz C., Catalán M., Ortiz A., Coca S., Egido J., *Cyclosporine A induces apoptosis in murine tubular epithelial cells. Role of caspases*, Kidney International Supplements, 68, 1998, s. 25-29.
9. da Silva J.B., de Melo Lima M.H., Secoli S.R., *Influence of cyclosporine on the occurrence of nephrotoxicity after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. A systematic review*, Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 36, 2014, s. 363-368.
10. Carlos C.P., Sonehara N.M., Oliani S.M., Burdmann E.A., *Predictive usefulness of urinary biomarkers for the identification of cyclosporine a-induced nephrotoxicity in a rat model*, PLoS One, 9, 2014.
11. Marchewka Z., Tacik A., Piwowar A., *KIM-1 and NGAL as potential biomarkers for the diagnosis and cancer progression*, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 70, 2016, s. 329-336.
12. Zheng X., Baker H., Hancock W.S., *Analysis of the low molecular weight serum peptidome using ultrafiltration and a hybrid ion trap-Fourier transform mass spectrometer*, Journal of Chromatography A, 1120, 2006, s. 173-184.
13. Kraj A., Drabik A., Silberring J., *Proteomika i metabolomika*, Wydawnictwa Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa 2010.
14. *Clinical proteomics: written in blood*, <https://www.nature.com/articles/425905a> [data dostępu: 21.09.2022].
15. Lamoureux F., Mestre E., Essig M., Sauvage F.L., Marquet P., Gastinel L.N., *Quantitative proteomic analysis of cyclosporine-induced toxicity in a human kidney cell line and comparison with tacrolimus*, Journal of Proteomics, 75, 2011, s. 677-694.
16. Kędzierska K., Sporniak-Tutak K., Sindrewicz K., Bober J., Domański L., Parafiniuk M., Urańska E., Ciechanowicz A., Domański M., Smektała T., Masiuk M., Skrzypczak W., Ożgo M., Kabat-Koperska J., Ciechanowski K., *Effects of immunosuppressive treatment on protein expression in rat kidney*, Drug Design, Development and Therapy, 8, 2014, s. 1695-1708.
17. Puigmule M., Lopez-Hellin J., Sune G., Tornavaca O., Camano S., Tejedor A., Meseguer A., *Differential proteomic analysis of cyclosporine A-induced toxicity in renal proximal tubule cells*, Nephrology Dialysis Transplantation, 24, 2009, s. 2672-2686.

18. Carreras-Planella L., Juega J., Taco O., Cañas L., Franquesa M., Lauzurica R., Borràs F.E., *Proteomic characterization of urinary extracellular vesicles from kidney-transplanted patients treated with calcineurin inhibitors*, International Journal of Molecular Sciences, 21, 2020.
19. Prunotto M., Ghiggeri G., Bruschi M., Gabbiani G., Lescuyer P., Hoher B., Chaykovska L., Berrera M., Moll S., *Renal fibrosis and proteomics. Current knowledge and still key open questions for proteomic investigation*, Journal of Proteomics, 74, 2011, s. 1855-1870.
20. Han X., Aslanian A., Yates J.R., *Mass spectrometry for proteomics*, Current Opinion in Chemical Biology, 12, 2008, s. 483-490.
21. Suder P., Bodzoń-Kuśkowska A., Silberring J. (red.), *Spektrometria mas*, Wydawnictwa AGH, Kraków 2016.
22. Charakterystyka produktu leczniczego Equoral, https://leki.urpl.gov.pl/files/25_Equoral_kap_ela_25_50_100.pdf [data dostępu: 1.03.2023].
23. Lu D., Wang J., Shi X., Yue B., Hao J., *AHNAK2 is a potential prognostic biomarker in patients with PDAC*, Oncotarget, 8, 2017, s. 31775-31784.
24. Wang M., Li X., Zhang J., Yang Q., Chen W., Jin W., Huang Y.-R., Yang R., Gao W.-Q., *AHNAK2 is a novel prognostic marker and oncogenic protein for clear cell renal cell carcinoma*, Theranostics, 7, 2017, s. 1100-1113.
25. Salih M., Demmers J.A., Bezstarosti K., Leonhard W.N., Losekoot M., van Kooten C., Gansevoort R.T., Peters D.J.M., Zietse R., Hoorn E.J., *Proteomics of urinary vesicles links plakins and complement to polycystic kidney disease*, Journal of the American Society of Nephrology, 2016, 27, s. 3079-3092.
26. Zager R.A., Johnson A.C.M., Frostad K.B., *Rapid renal alpha-1 antitrypsin gene induction in experimental and clinical acute kidney injury*, PLoS One, 9, 2014.
27. Stöhr C.G., Steffens S., Polifka I., Jung R., Kahlmeyer A., Ivanyi P., Weber F., Hartmann A., Wullich B., Wach S., Helge T., *Piwi-like 1 protein expression is a prognostic factor for renal cell carcinoma patients*, Scientific Reports, 9(1), 2019.
28. Li T., Yu C., Zhuang S., *Histone methyltransferase EZH2. A potential therapeutic target for kidney diseases*, Frontiers in Physiology, 12, 2021.
29. Guo D.-F., Beyer A.M., Yang B., Nishimura D.Y., Sheffield V.C., Rahmouni K., *Inactivation of Bardet-Biedl syndrome genes causes kidney defects*, American Journal of Physiology. Renal Physiology, 300(2), 2011, s. 574-580.
30. Akbari M., Nayeri H., Nasri H., *Association of fetuin-a with kidney disease. A Review on current concepts and new data*, Journal of Nephropharmacology, 8(2), 2018, s. 14.
31. Grocholska P., Konieczny A., Kaźmierczak Z., Dąbrowska K., Panek-Laszczyńska K., Kłak M., Witkiewicz W., Szewczuk Z., Bąchor R., *Peptide charge derivatization as a tool for early detection of preeclampsia by mass spectrometry – a comparison with the ELISA test*, Molecules, 26, 2021, s. 7102.
32. Bąchor R., Gąszczyk D., Panek-Laszczyńska K., Konieczny A., Witkiewicz W., Stefanowicz P., Szewczuk Z., *Detection of podocin in human urine sediment samples by charge derivatization and LC-MS-MRM method*, International Journal of Molecular Sciences, 21, 2020, s. 3225.
33. Waliczek M., Bąchor R., Kijewska M., Gąszczyk D., Panek-Laszczyńska K., Konieczny A., Dąbrowska K., Witkiewicz W., Marek-Bukowiec K., Tracz J., Łuczak M., Szewczuk Z., Stefanowicz P., *Isobaric duplex based on a combination of 16O/18O enzymatic exchange and labeling with pyrylium salts*, Analytica Chimica Acta, 1048, 2019, s. 96-104.

Analiza profili białkowych u pacjentów poddanych terapii cyklosporyną A z zastosowaniem spektrometrii mas

Streszczenie

Cyklosporyna A (CsA) to lek immunosupresyjny powszechnie stosowany w transplantologii, działający m.in. poprzez blokowanie transkrypcji genów cytokin w aktywowanych limfocytach T. Mimo szerokiego zastosowania w medycynie CsA wykazuje znaczną nefrotoksyczność, która może objawiać się zmiennością profili proteomicznych krwi. Możliwość przewidzenia skutków niepożądanych farmakoterapii, takich jak nefrotoksyczność CsA, poprzez wykrycie charakterystycznych zmian w proteomie materiału biologicznego jest ważna, ponieważ zidentyfikowanie stanu chorobowego na wczesnym etapie pomoże zminimalizować ryzyko uszkodzenia nerek. Celem niniejszej pracy było określenie możliwości zastosowania spektrometrii mas do identyfikacji białek w próbkach krwi pacjentów poddanych terapii cyklosporyną A z występującymi stanami patologicznymi nerek. Uzyskane wyniki badań jednoznacznie wskazują na obecność białek związanych z rozwijającymi się lub rozwiniętymi już dysfunkcjami nerek, co potwierdza aplikacyjność analizy proteomicznej metodą spektrometrii mas. W przypadku problemu, jakim jest niewystarczająca czułość analizy, autorzy proponują zastosowanie metod derywatyzacji ładunkowej, co pozwoli na znaczne zwiększenie wydajności jonizacji w analizie metodą spektrometrii mas.

Słowa kluczowe: proteomika, nefrotoksyczność, cyklosporyna A, LC-MS/MS

Analysis of protein profiles in patients undergoing cyclosporin A therapy using mass spectrometry

Abstract

Cyclosporin A (CsA) is an immunosuppressive drug commonly used in transplantation, which works, among other things, by blocking the transcription of cytokine genes in activated T lymphocytes. Despite its widespread use in medicine, CsA exhibits significant nephrotoxicity, which can manifest as variations in the proteomic profiles of blood. The ability to predict adverse effects of pharmacotherapy such as CsA nephrotoxicity by detecting characteristic changes in the proteome of biological material is important because identifying the condition at an early stage will help minimize the risk of kidney damage. The purpose of the present study was to determine the feasibility of using mass spectrometry to identify proteins in blood samples of patients undergoing cyclosporin A therapy with pathological conditions of kidneys. Obtained results clearly indicate the presence of proteins associated with developing renal dysfunctions, confirming the applicability of proteomic analysis by mass spectrometry for this purpose. For the problem of insufficient sensitivity of the analysis, the authors propose the use of charge derivatization methods, which will allow a significant increase in ionization efficiency in mass spectrometry analysis.

Keywords: proteomics, nephrotoxicity, cyclosporin A, LC-MS/MS

Wpływ metali ciężkich na środowisko i człowieka

1. Wprowadzenie

Zanieczyszczenie metalami ciężkimi odnosi się do nadmiernego gromadzenia się toksycznych metali ciężkich w wodzie i glebie spowodowanego działalnością człowieka. Zanieczyszczenie środowiska metalami ciężkimi dotyczy szczególnie metali o dużej toksyczności biologicznej, takich jak rtęć (Hg), kadm (Cd), ołów (Pb), chrom (Cr) i arsen (As), a także innych metali wykazujących możliwe negatywne oddziaływanie na organizmy żywe, jak cynk (Zn), miedź (Cu), nikiel (Ni), cyna (Sn), wanad (V) [1, 2]. W ostatnich latach – wraz z rozwojem gospodarki światowej – zarówno rodzaj, jak i zawartość metali ciężkich w glebie oraz żywności stopniowo zwiększa się, powodując pogorszenie stanu środowiska. Metale ciężkie są bardzo niebezpieczne dla środowiska i organizmów żywych. Obecność metali ciężkich w glebie jest problematyczna, gdyż zanieczyszczenia w glebie utrzymują się przez długi czas, a zabiegi, które umożliwiają ich usuwanie są kosztochłonne i mają ograniczone zastosowanie. Metale ciężkie mogą być następnie pobierane przez rośliny, a w późniejszym etapie kumulować się w poszczególnych ogniwach łańcucha pokarmowego człowieka i ostatecznie oddziaływać na niego samego [3-5].

2. Przenikanie metali ciężkich do środowiska

Metale ciężkie występują naturalnie w środowisku i mogą w nim migrować w wyniku erupcji wulkanicznych oraz podczas zachodzących procesów glebotwórczych [3, 6]. Jednakże w dużej mierze metale ciężkie wprowadzane są do środowiska ze źródeł antropogenicznych, które odznaczają się większą mobilnością w glebie aniżeli metale uwalniane z procesów glebotwórczych [7]. Metale ciężkie mogą przenikać do środowiska z wielu antropogenicznych źródeł, takich jak kopalnie metali, przemysł energetyczny, motoryzacja, farby, stosowanie nawozów, usuwanie odpadów o wysokiej zawartości metali, niewłaściwie zabezpieczone składowiska, odchody zwierzęce, osady ściekowe, pozostałości po spalaniu węgla, kompost, produkty petrochemiczne, pestycydy, a także w wyniku depozycji metali z atmosfery [2, 5, 8]. Przedstawia to rysunek 1.

2.1 Rolnictwo

Nawozy mineralne, pestycydy i nawozy naturalne są ważnymi środkami stosowanymi w produkcji rolnej. Niemniej jednak długotrwałe nadmierne stosowanie tych produktów, które w swoim składzie zawierają śladowe ilości metali ciężkich, może spowodować zanieczyszczenie gleb [9].

¹ waldemar.studzinski@pbs.edu.pl, Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej, Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich, ul. Seminaryjna 3, 85-326 Bydgoszcz.

² daria.bozejwicz@pbs.edu.pl, Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej, Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich, ul. Seminaryjna 3, 85-326 Bydgoszcz.

³ katarzyna.witt@pbs.edu.pl, Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej, Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich, ul. Seminaryjna 3, 85-326 Bydgoszcz.



Rysunek 1. Źródła przenikania metali ciężkich do środowiska [opracowanie własne]

2.1.1. Nawozy mineralne

Wzrost chemizacji rolnictwa spowodował, że ogromne ilości nawozów stosowane są w rolnictwie, aby dostarczyć odpowiedniej ilości pierwiastków biogennych (N, K i P) dla wzrostu upraw. Najczęściej identyfikowanymi zanieczyszczeniami w nawozach mineralnych są metale ciężkie. Zawartość metali ciężkich w nawozach azotowych i potasowych jest stosunkowo niska, podczas gdy w nawozach fosforowych może znajdować się znaczna ilość toksycznych metali ciężkich. Metale ciężkie w nawozach wieloskładnikowych pochodzą głównie z surowców podstawowych i procesów produkcyjnych. Zawartość metali ciężkich w nawozach jest następująca: nawóz fosforowy > nawóz wieloskładnikowy > nawóz potasowy > nawóz azotowy. Jednym z metali zanieczyszczających glebę jest kadm. Wprowadzany jest do gleb z nawozami fosforowymi. Wiele badań wykazało, że po zastosowaniu tych nawozów zawartość Cd w glebie stale wzrasta, co przekłada się na wzrost pobierania Cd przez rośliny [10, 11].

2.1.2. Pestycydy

Liczne znane pestycydy stosowane powszechnie w rolnictwie w przeszłości zawierały znaczne ilości metali. Niektóre pestycydy dopuszczone do stosowania zawierały w swoim składzie kompleksy Cu, Hg, Pb, Mn lub Zn (na przykład fungicydy zawierają miedź). Z kolei arsenian ołowiu przez lata był stosowany w sadach owocowych w celu zwalczania niektórych pasożytów. Związki składające się z arsenu były szeroko stosowane do zwalczania kleszczy i do zwalczania owadów na plantacjach bananów w Nowej Zelandii i Australii. Obecnie w wielu glebach uprawnych stężenie metali ciężkich znacznie przewyższa stężenie naturalne [12, 13].

2.1.3. Nawozy oraz osady ściekowe

Zastosowanie nawozów naturalnych i organicznych (kompostów, obornika bydlęcego) może przyczyniać się do kumulacji metali ciężkich w glebie, takich jak As, Cd, Cr, Cu, Pb, Hg, Se, Ni, Mo, Zn, Sb [14]. Niektóre odchody (zwierząt gospodarskich – bydła, trzody chlewnej, drobiu) zwykle są wprowadzane na pola uprawne i łąki w postaci stałej lub półpłynnej. W chowie drobiu i trzody chlewnej miedź i cynk są dostarczane

z paszą jako stymulatory wzrostu, dodatkowo w produktach fitness dla drobiu obecny jest arsen [15]. Nawozy, które powstają z odchodów tych zwierząt, mają większe ilości Cu, As i Zn. Jeśli są stale wprowadzane do gleby, mogą powodować gromadzenie się tych metali. Osady ściekowe to substancje o charakterze organicznym, powstające w wyniku oczyszczania ścieków, które można z pożytkiem ponownie wykorzystać [16]. Metalami ciężkimi najczęściej kumulującymi się w osadach są Ni, Pb, Cd, Cu, Cr i Zn. Zawartość metali zależy od natury i zaawansowania procesów przemysłowych, a także od rodzaju i czynności wykonywanych podczas obróbki osadów [2, 17]. W określonych sytuacjach osady ściekowe, które były stosowane do nawożenia gleb, wprowadzały również metale ciężkie, które ulegały migracji w profilu glebowym i mogły powodować zanieczyszczenie wód gruntowych. Stwierdzono zwiększenie zawartości Ni, Cd i Zn w warstwie drenazowej po zastosowaniu osadów ściekowych [17-19].

2.2. Ścieki

Wprowadzanie ścieków komunalnych do gleb jest prowadzone od przeszło 400 lat i obecnie to powszechna praktyka w różnych częściach globu [20]. Nawadnianie ściekami stanowi realny sposób rozwiązania problemu nawadniania upraw na obszarach suchych. Przypuszczalnie w skali światowej około 20 milionów hektarów (ha) gruntów ornych jest nawadnianych jakimś rodzajem ścieków. W niektórych badaniach pojawiają się informacje, że miasta afrykańskie i azjatyckie opierają się na nawadnianiu ściekami nawet 50% upraw warzywnych [21]. Chociaż ilość metali w ściekach stosowanych jest stosunkowo niska, długotrwałe podlewanie gruntów takimi ściekami może ostatecznie spowodować gromadzenie się w glebie takich metali ciężkich jak Hg, Cd, Pb, Cr itp. W celu zapewnienia jakości irygacji ścieki muszą być ściśle kontrolowane w ramach krajowych norm jakości wody do nawadniania pól uprawnych [22].

2.3. Odpady przemysłowe i procesy wydobywania metali

Wydobywanie i obróbka minerałów zawierających metale powoduje wprowadzenie do gleby zanieczyszczeń metalicznych. Dodatkowo w procesach przetwórczych powstaje wiele odpadów stałych o złożonym składzie, w tym odpady górnicze i przemysłowe. W trakcie składowania lub zagospodarowywania odpadów metale ciężkie przenikają do środowiska wskutek działania światła słonecznego, opadów i procesu wymywania. Metale zawarte w odpadach mogą łatwo rozprzestrzeniać się do środowiska za pomocą wiatru i wody [23, 24].

2.4. Zanieczyszczenie atmosferyczne

Metale ciężkie w atmosferze pochodzą głównie z gazów i pyłów wytwarzanych przez energetykę, transport, metalurgię i produkcję materiałów budowlanych. Metale ciężkie, z wyjątkiem rtęci, zasadniczo przedostają się do atmosfery w postaci aerozolu i osadzają się w glebie w wyniku naturalnej sedymentacji oraz razem z opadami atmosferycznymi. Na przykład w Szwecji zanieczyszczenie ołowiem [25] było spowodowane działalnością miejskiego przemysłu miedziowego, fabryki kwasu siarkowego, fabryki farb oraz dużej ilości odpadów z górnictwa i przemysłu chemicznego. Dodatkowo drobne cząsteczki ołowiu, przenoszone przez wiatr, rozprzestrzeniały się z hałd odpadów przemysłowych do otaczającego terenu [26].

Transport, zwłaszcza samochodowy, powoduje poważne zanieczyszczenie metalami ciężkimi (Pb, Zn, Cd, Cr, Cu itp.) atmosfery i gleb. Metale ciężkie pochodziły ze spalania

benzyny ołowiowej oraz pyłów wytwarzanych przez zużywanie opon samochodowych. Z raportu Wu i wsp. wynika, że spaliny samochodowe zawierały do 20-50 $\mu\text{g/l}$ Pb, co utworzyło strefowy rozkład i występowanie wyraźnej różnicy stężenia metali ciężkich w glebie w zależności od odległości od linii kolejowej, autostrady, centrum miasta. Przyczyniło się to później do wycofania benzyny ołowiowej [27]. W prowincji Nanjing Nanjing – Hangzhou stwierdzono skażenie gleby Pb, Cr i Co po obu stronach autostrady, a strefa skażenia ustępowała wraz z dystansem od autostrady. Ilość metali ciężkich, które są wprowadzane do gleby poprzez naturalne osadzanie pyłów i gazów, a także z opadem atmosferycznym, często jest związana z poziomem rozwoju przemysłu ciężkiego, gęstością zaludnienia, użytkowaniem gruntów i natężeniem ruchu drogowego [28].

3. Wpływ na środowisko

Kumulacja metali ciężkich w glebie niekorzystnie wpływa na jej właściwości i może również ograniczać biodegradację zanieczyszczeń organicznych. Poza tym przenikanie metali ciężkich w głąb gleby może przyczynić się do zanieczyszczenia wód podziemnych i stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia człowieka [29, 30]. Metale ciężkie nie rozkładają się, lecz mogą ulegać bioakumulacji i biomagnifikacji, co może spowodować negatywne oddziaływanie na środowisko. Niektóre metale ciężkie działają jako mikroelementy i są zaangażowane w ważne procesy metaboliczne i komórkowe. W znacznym stężeniu są jednak toksyczne [31, 32].

3.1. Wpływ na mikroorganizmy glebowe i aktywność enzymatyczną

Aktywność microbiologiczna i aktywność enzymatyczna w czuły sposób odzwierciedlają jakość gleby. Stwierdzono, że biomasa mikroorganizmów glebowych jest istotnym parametrem określającym stopień zanieczyszczenia gleby [33]. W glebie zanieczyszczonej metalami ciężkimi aktywność drobnoustrojów jest znacznie zahamowana. Kandelera i wsp. [34] wykazali, że biomasa drobnoustrojów została poważnie zahamowana w glebie zanieczyszczonej Cu, Zn, Pb i innymi metalami ciężkimi. Biomasa microbiologiczna gleby w pobliżu kopalni była znacznie uboższa niż w glebie oddalonej od kopalni. Inni naukowcy również potwierdzili, że znaczne stężenie metali ciężkich hamuje aktywność drobnoustrojów, a niskie stężenia metali ciężkich może stymulować wzrost drobnoustrojów i przyczyniać się do zwiększenia biomasy drobnoustrojów [36]. Również aktywność enzymów w glebie jest związana z zanieczyszczeniem metalami ciężkimi. Stwierdzono, że wysokie stężenia metali ciężkich powodowały znaczne zmniejszenie enzymów w środowisku glebowym. Jest to bardzo ważne, ponieważ enzymy w glebie odgrywają istotną rolę w procesie rozkładu materii organicznej i obiegu składników pokarmowych [30].

3.2. Wpływ na rośliny

W zależności od rodzaju, stężenia oraz form metali ciężkich w środowisku – mogą one w różny sposób oddziaływać na rośliny. Metale takie jak Fe, Mn, Cu, Zn, Mo w niewielkich stężeniach mogą oddziaływać stymulująco, ponieważ są konieczne dla prawidłowego przebiegu procesów metabolicznych. Warto nadmienić, że niektóre metale (As, Hg, Pb, Cd) już nawet w niskich stężeniach mogą wykazywać działanie toksyczne [36].

Migracja metali ciężkich z gleby do organizmów zwierząt i ludzi odbywa się głównie przez rośliny, które są istotnym ogniwem w łańcuchu pokarmowym (gleba – roślina – zwierzę – człowiek) [37, 38].

Zanieczyszczenie metalami ciężkimi zmniejsza aktywność mikroorganizmów ryzo-sfery, co jest ważnym czynnikiem hamującym rozwój roślin i zmniejszającym ich odporność na patogeny. Zaburzenie rozkładu materii organicznej przez mikroorganizmy glebowe może także doprowadzić do zwiększenia puli biodostępnych form metali. Jest to bardzo niebezpieczne, ponieważ biodostępna forma metali ciężkich w sposób łatwy jest pobierana przez organizmy żywe i może przemieszczać się w łańcuchu troficznym [39, 40]. Przyswajanie metali ciężkich przez rośliny zachodzi przez system korzeniowy, a także przez blaszki liściowe. Najłatwiej pobierane przez rośliny są metale występujące w formie wolnych jonów [21, 22]. Dodatkowo korzenie roślin mogą wydzielać do gleby substancje aktywne takie jak kwasy organiczne oraz związki chelatujące metale – umożliwiające uwalnianie metali z kompleksów glebowych. Ilość pobieranych przez rośliny metali ciężkich zależy od rodzaju metalu, stężenia w glebie, formy wstępowania oraz od gatunku rośliny. Zawartość metali ciężkich w różnych tkankach roślin zmniejsza się wg kolejności: korzeń > liście > łodyga > kwiaty > nasiona [36, 40]. Zbyt wysoka zawartość metali ciężkich powoduje przekroczenie progu tolerancji rośliny i toksyczne oddziaływanie, które może doprowadzić nawet do obumarcia rośliny. Stwierdzono, że jeśli zawartość miedzi w glebie przekracza 50 mg/kg, ma to negatywny wpływ na sadzonki cytrusów; gdy zawartość miedzi w glebie osiąga 200 mg/kg – pszenica usycha. Wykazano, że przy stężeniu Cd 30 $\mu\text{mol/l}$ wzrost sadzonek kapusty i fasoli był hamowany oraz zmniejszeniu uległa długość korzeni, a także wysokość rośliny i powierzchnia liści. Dodatkowo Cd może zakłócać fotosyntezę i syntezę białek oraz powodować uszkodzenie błony komórkowej itp. [41]. Wpływ metali ciężkich na środowisko glebowe oraz oddziaływanie na rośliny zostały przedstawione na rysunku 2.



Rysunek 2. Oddziaływanie metali ciężkich na procesy glebowe oraz rośliny [opracowanie własne]

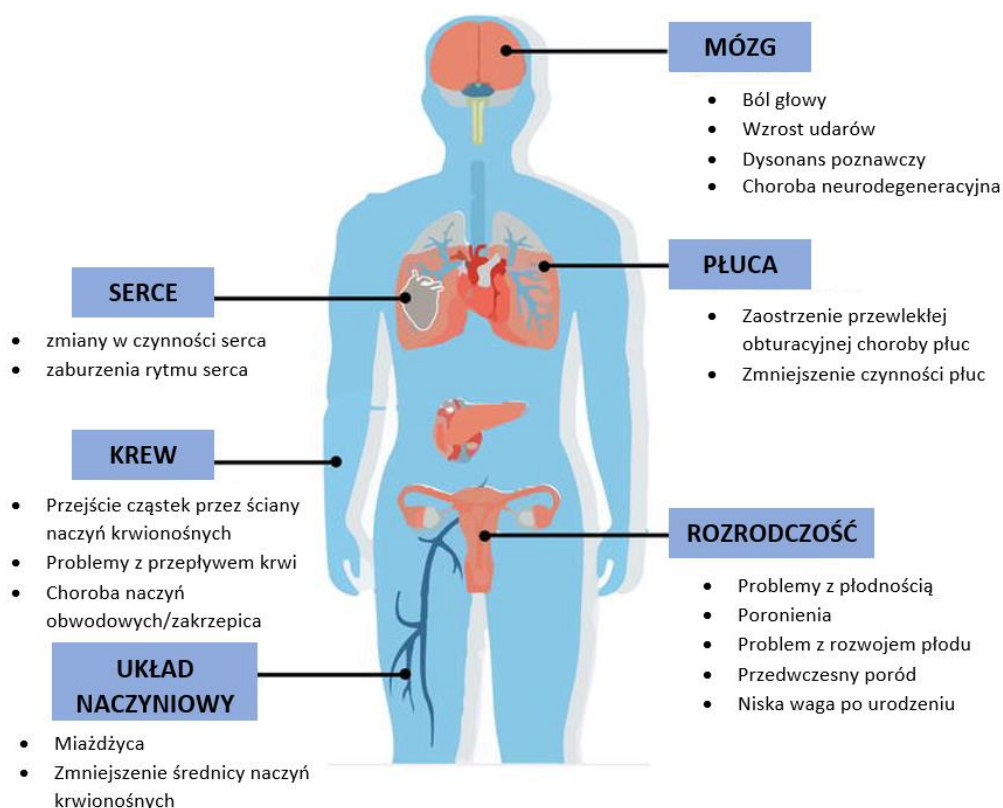
3.3. Środowisko wodne

Wprowadzanie odpadów i ścieków pochodzących z działalności wydobywczej do środowiska wodnego ma wpływ na elementy biotyczne (ryby, skorupiaki, owady i wodne rośliny) oraz abiotyczne (woda i osad). Bezkęgowce mogą gromadzić metale ciężkie, które są niezbędne do funkcjonowania organizmu, jak również mogą oddziaływać toksycznie. Toksyczny efekt związany jest z dużym stężeniem metali ciężkich i przekroczeniem wartości progowej. Zanieczyszczenie metalami ciężkimi (Cu, Zn, Pb, Cd, Hg i Cr) stwierdzono między innymi w Tianjin (Chiny), identyfikując je w wodzie, produktach pochodzenia roślinnego oraz rybach. Stwierdzono, że spożywanie skażonych warzyw i ryb stwarza duże ryzyko toksykologiczne, szczególnie dla dzieci [42, 43]. Na podstawie analizy ilościowej metali ciężkich takich jak Fe, Mn, Zn, Cr, Cu, Co, Ni, Pb i Cd w wodach powierzchniowych rzeki Mahanadi – można stwierdzić, że w próbach wody oznaczono wysokie stężenia metali ciężkich. Stężenia Ni, Pb i Cd przekraczają dopuszczalną wartość graniczną. Zanieczyszczenie wody metalami ciężkimi degraduje środowisko i powoduje realne zagrożenia dla zdrowia. Metale ciężkie dostają się do organizmu człowieka poprzez zanieczyszczoną wodę lub poprzez łańcuch pokarmowy. Narażenie organizmu człowieka na metale ciężkie może prowadzić do różnych chorób, takich jak: uszkodzenie nerek, pogorszenie zachowania i inteligencji, nowotwór, a także do śmierci [44, 45].

4. Wpływ na zwierzęta i ludzi

Do organizmów zwierząt i ludzi metale ciężkie przedostają się głównie drogą pokarmową. Skutki zdrowotne ciągłego spożywania produktów, które zawierają nawet śladowe ilości tych pierwiastków, mogą wystąpić nawet po wielu latach. Absorpcja metali ciężkich poprzez wdychanie powoduje wchłanianie i szybkie rozprowadzenie ich przez układ krążenia [36, 47]. Metale ciężkie mogą również być wchłaniane przez skórę. Metale ciężkie u zwierząt i ludzi wywołują zmiany w syntezie białka i zaburzenia wytwarzania ATP, a w konsekwencji może dochodzić do zmian chorobowych, w tym nowotworów. Skala oddziaływania zależy od ilości przyswajanego pierwiastka przez organizm. Stopień toksyczności zależy również od rodzaju związku (w jakim metale występują), jego formy, rozpuszczalności w płynach ustrojowych i lipidach, czasu ekspozycji, a także odporności indywidualnej danego osobnika [43-48]. Metale w formie nieorganicznych kationów charakteryzują się skłonnością do silnego powiązania z białkami i tkankami. Powoduje to bioakumulację i hamuje wydzielanie ich z organizmu. Toksyczne działanie metali ciężkich na zwierzęta i ludzi jest bardzo różnorodne. Do najbardziej toksycznych metali ciężkich zaliczyć można: Pb, Hg i Cd. Metale ulegają bioakumulacji w określonych organach, a rakotwórcze oddziaływanie następuje, gdy poziom metalu w określonym organizmie osiągnie lub przekroczy dawkę progową. Metale ciężkie głównie wpływają na wątrobę i nerki, czyli organy odpowiadające za detoksykację. Dodatkowo stwierdza się również kumulację metali w kościach, mózgu i mięśniach. Metale mogą wywołać natychmiastowe ostre zatrucia lub stany przewlekłe. Zatrucia ostre powodują metale takie jak: As, Zn, Cd, Cu i Hg. Zatrucia przewlekłe mogą wywoływać m.in.: As, Zn, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Sn, Co, Ni, Mn, Se, Fe i Ag. Schorzenia przewlekłe występują przez długi okres w formie utajonej. Po dłuższym czasie mogą one spowodować zmiany mutagenne lub uszkodzenia centralnego systemu nerwowego [47-51].

Metale ciężkie nie podlegają degradacji biologicznej. Ich detoksykacja przez organizmy polega na wiązaniu w połączeniu z białkami lub na odkładaniu ich w formie nierozpuszczalnej w przestrzeniach międzykomórkowych celem składowania lub wydalenia z organizmu. Odnotowano selektywność tkanek organizmu w wiązaniu metali ciężkich. Toksyczny ołów i radioaktywny radon gromadzą się w tkance kostnej, natomiast nerki i wątroba gromadzą głównie kadm oraz rtęć [47-49]. Wybrane toksyczne oddziaływanie metali ciężkich na organizm ludzi przedstawiono na rysunku 3.



Rysunek 3. Wpływ metali ciężkich na człowieka [opracowanie własne]

Narażenie organizmu człowieka na metale ciężkie powoduje choroby związane z zaburzeniami funkcji wybranych narządów – uszkodzenie nerek, nowotwory, poronienia u kobiet, obniżenie inteligencji. Zatrucie ołowiem powoduje zaburzenia intelektualne u dzieci. Toksyczność rtęci skutkuje chorobą Minamata, podczas gdy zatrucie kadmem powoduje chorobę itai-itai. Metale ciężkie mogą również powodować toksyczność w niektórych narządach – nefrotoksyczność, neurotoksyczność, hepatotoksyczność, toksyczność skórna i toksyczność sercowo-naczyniowa. Przy ekspozycji na wysokie stężenia metali ciężkich – mogą one powodować nawet śmierć [47-53].

W celu uniknięcia toksycznych skutków zanieczyszczeń środowiska metalami ciężkimi konieczne jest lokowanie osiedli mieszkaniowych poza miejscami przemysłowymi, gdzie emisja metali ciężkich jest znaczna, a także wprowadzanie technologii ograniczających ich emisję [47].

5. Podsumowanie

W grupie metali ciężkich są zarówno pierwiastki niezbędne do funkcjonowania organizmów żywych, jak i pierwiastki, które nie spełniają żadnej roli fizjologicznej. Jednakże wszystkie metale po przekroczeniu dopuszczalnej granicy działają toksycznie na organizmy roślin, zwierząt i ludzi. Do najbardziej toksycznych, wywołujących liczne schorzenia, zalicza się rtęć, ołów, kadm, arsen i chrom. Metale ciężkie w organizmach żywych powodują w głównej mierze zmiany w syntezie białka i zaburzenia wytwarzania ATP, a w konsekwencji mogą zachodzić poważne zmiany chorobowe, łącznie z nowotworowymi. Toksyczne oddziaływanie metali ciężkich zależy przede wszystkim od stężenia wprowadzonego do organizmu metalu. Warto podkreślić, że stopień toksyczności zależy również od formy chemicznej, w jakiej pierwiastki występują, rozpuszczalności w płynach ustrojowych i lipidach, czasu ekspozycji na organizm, a także indywidualnej odporności organizmu. W celu ograniczenia niekorzystnego oddziaływania metali ciężkich na rośliny, zwierzęta i ludzi należałoby zmniejszyć ilość wprowadzanych do środowiska metali ze źródeł antropogenicznych.

Literatura

1. Sayadi M.H., Rezaei M.R., *Impact of land use on the distribution of toxic metals in surface soils in Birjand city, Iran*, Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences, 4(1), 2014, s.8-29.
2. Chen S., *Occurrence characteristics and ecological risk assessment of heavy metals in sewage sludge*, IOP Conference Series. Earth and Environmental Science, 295(5), 2019, s. 52041, <https://doi.org/10.1088/1755-1315/295/5/052041>.
3. Espinoza-Guillen J.A., Alderete-Malpartida M.B., Gallegos-Huamán R.L., *Ecological risk assessment and identification of sources of heavy metals contamination in sewage sludge from municipal wastewater treatment plants in the Metropolitan Area of Lima-Callao, Peru*, Environment, Development and Sustainability, 2022, <https://doi.org/10.1007/s10668-022-02774-w>.
4. Zojaji F., Hassani A.H., Sayadi M.H., *Bioaccumulation of chromium by Zea mays in wastewater-irrigated soil. An experimental study*, Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences, 4(2), 2014, s. 62-67.
5. Tytla M., *Assessment of heavy metal pollution and potential ecological risk in sewage sludge from municipal wastewater treatment plant located in the most industrialized region in Poland. Case study*, International Journal of Environmental Research and Public Health, 16(13), 2019, s. 2430, <https://doi.org/10.3390/ijerph16132430>.
6. Singh R., Gautam N., Mishra A., Gupta R., *Heavy metals and living systems. An overview*, Indian J Pharmacol, 43(3), 2011, s. 246-253, doi: 10.4103/0253-7613.81505.
7. Loska K., Wiechuła D., Korus I., *Metal contamination of farming soils affected by industry*, Environment International, 30(2), 2004, s. 159-165, [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(03\)00157-0](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(03)00157-0).
8. Elvira M.V., Faustino-Eslava D.V., Fukuyama M., de Chavez E.R.C., Padrones J.T., *Ecological risk assessment of heavy metals in the bottom sediments of Laguna de Bay, Philippines*, Mindanao J Sci Technol, 18(2), 2020, s. 311-335.
9. Zhang M.K., Liu Z.Y., Wang H., *Use of single extraction methods to predict bioavailability of heavy metals in polluted soils to rice*, Communications in Soil Science and Plant Analysis, 41(7), 2010, s. 820-831.
10. Boyd R.S., *Heavy metal pollutants and chemical ecology. Exploring new frontiers*, Journal of Chemical Ecology, 36, 2010, s. 46-58.

11. Kazi T., Arain M., Jamali M., Jalbani N., Afridi H., Sarfraz R., Shah A., *Assessment of water quality of polluted lake using multivariate statistical techniques. A case study*, Ecotoxicology and Environmental Safety, 72(2), 2009, s. 301-309, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.02.024>.
12. Arao T., Ishikawa S., Murakami M., *Heavy metal contamination of agricultural soil and counter measures in Japan*, Paddy and Water Environment, 8(3), 2010, s. 247-257.
13. McLaughlin M.J., Hamon R.E., McLaren R.G., Speir T.W., Rogers S.L., *Review: a bioavailability-based rationale for controlling metal and metalloid contamination of agricultural land in Australia and New Zealand*, Australian Journal of Soil Research, 38(6), 2000, s. 1037-1086.
14. Basta N.T., Ryan J.A., Chaney R.L., *Trace element chemistry in residual-treated soil. Key concepts and metal bioavailability*, Journal of Environmental Quality, 34(1), 2005, s. 49-63.
15. Sumner M.E., *Beneficial use of effluents, wastes, and bio solids*, Communications in Soil Science and Plant Analysis, 31(11-14), 2000, s. 1701-1715.
16. Tytla M., *Identification of the chemical forms of heavy metals in municipal sewage sludge as a critical element of ecological risk assessment in terms of its agricultural or natural use*, International Journal of Environmental Research and Public Health, 17(13), 2020, s. 4640, <https://doi.org/10.3390/ijerph17134640>.
17. Agoro M.A., Adeniji A.O., Adefisoye M.A., Okoh O.O., *Heavy metals in wastewater and sewage sludge from selected municipal treatment plants in Eastern Cape Province, South Africa*, Water Research, 12(10), 2020, s. 2746, <https://doi.org/10.3390/w12102746>.
18. Černe M., Palčić I., Major N., Pasković, I., Perković J., Užila Z., Filipović V., Romić M., Ban S.G., Heath D.J., Ban D., *Effect of sewage sludge-derived amendments on the nutrient uptake by Chinese cabbage from Mediterranean soils*, Journal of Plant Nutrition, 2022, <https://doi.org/10.1080/01904167.2022.2071732>.
19. Demirbas A., Edris G., Alalayah W.M., *Sludge production from municipal wastewater treatment in sewage treatment plant*, Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization and Environmental Effects, 39(10), 2017, s. 999-1006, <https://doi.org/10.1080/15567036.2017.1283551>.
20. Duan B., Zhang W., Zheng H., Wu C., Zhang Q., Bu Y., *Comparison of health risk assessments of heavy metals and as in sewage sludge from wastewater treatment plants (WWTPs) for adults and children in the urban district of Taiyuan, China*, International Journal of Environmental Research and Public Health, 14(10), 2017, s. 1194, <https://doi.org/10.3390/ijerph14101194>.
21. Bjuhr J., *Trace metals in soils irrigated with waste water in a periurban area downstream Hanoi City, Vietnam*, seminar paper, Institutionen för Markvetenskap, Sveriges Lantbruksuniversitet (SLU), Uppsala (Sweden) 2007.
22. Geng Y.M., Zhang C.B., Zhang Y., Huang D.D., Yan S.X., Sun T.F., Cheng L., Wang J., Mao Y.X., *Speciation and ecological risk assessment of heavy metal(loid)s in the municipal sewage sludge of China*, Environmental Sciences, 42(10), 2021, s. 4834-4843, <https://doi.org/10.13227/j.hjxx.202101145>.
23. DeVolder P.S., Brown S.L., Hesterberg D., Pandya K., *Metal bioavailability and speciation in a wetland tailings repository amended with bio solids compost, wood ash and sulfate*, Journal of Environmental Quality, 32(3), 2003, s. 851-864.
24. Ding Y., *The management of polluted soils by heavy metal*, Environment and Development, 2000, 15(2), s. 25-28.
25. Lin Z.Y., *The source and fate of Pb in central Sweden*, Science of the Total Environment, 209(1), 1998, s. 47-58.
26. Harrison R.M., Tilling R., Romero M.S.C., Harrad S., Jarvis K., *A study of trace metals and polycyclic aromatic hydrocarbons in the roadside environment*, Atmospheric

- Environment, 37(17), 2003, s. 2391-2402, [https://doi.org/10.1016/S1352-2310\(03\)00122-5](https://doi.org/10.1016/S1352-2310(03)00122-5).
27. Wu J., Lu J., Li L., Min X., Luo Y., *Pollution, ecological-health risks, and sources of heavy metals in soil of the northeastern Qinghai-Tibet Plateau*, Chemosphere, 201, 2018, s. 234-242, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.02.122>.
28. Chen H.M., *Behaviors and environmental quality of chemical substances in the soil*, Science Press, Beijing (China) 2002.
29. Miedico O., Iammarino M., Paglia G., Tarallo M., Mangiacotti M., Chiaravalle A.E., *Environmental monitoring of the area surrounding oil wells in Val d'Agri (Italy). Element accumulation in bovine and ovine organs*, Environ. Monit. Assess., 188, 2016, s. 338.
30. Ajarem J.S., Hegazy A.K., Allam G.A., Allam A.A., Maodaa S.N., Mahmoud A.M., *Heavy metal accumulation, tissue injury, oxidative stress, and inflammation in dromedary camels living near petroleum industry sites in Saudi Arabia*, Animals (Basel), 12(6), 2022, s. 707, doi: 10.3390/ani12060707.
31. Rzymiski P., Niedzielski P., Klimaszyk P., Poniedziałek B., *Bioaccumulation of selected metals in bivalves (Unionidae) and Phragmites australis inhabiting a municipal water reservoir*, Environ. Monit. Assess., 186, 2014, s. 3199-3212.
32. Rzymiski P., Tomczyk K., Rzymiski P., Poniedziałek B., Opala T., Wilczak M., *Impact of heavy metals on the female reproductive system*, Ann. Agric. Environ. Med., 22, 2015, s. 259-264.
33. Aceves M.B., Grace C., Ansorena J., *Soil microbial biomass and organic C in a gradient of zinc concentration in soils around a mine spoil tip*, Soil Biology and Biochemistry, 31(6), 1999, s. 867-876.
34. Kandeler E., Lurienegger G., Schwarz S., *Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities*, Biology and Fertility of Soils, 23, 1997, s. 299-306.
35. Johnston J.E., Lim E., Roh H., *Impact of upstream oil extraction and environmental public health. A review of the evidence*, Sci. Total Environ., 657, 2019, s. 187-199.
36. Ociepa-Kubicka A., Ociepa E., *Toksyczne oddziaływanie metali ciężkich na rośliny, zwierzęta i ludzi*, Inżynieria i Ochrona Środowiska, 2, 2012, s. 169-180.
37. Badura L., Krupa P., *Mikroorganizmy glebowe i ich znaczenie dla rozwoju roślin, materiał z konferencji: Dłaczność mikoryza jest szansą sukcesu dla roślin ogrodniczych i leśnych?*, Wyd. SGGW, Warszawa 2004.
38. Becker J.M., Parkin T., Nakatsu C.H., Wilbur J.D., Konopka A., *Bacterial activity, community structure and centimeter-scale spatial heterogeneity in contaminated soil*, Microbial. Ecol., 51, 2006, s. 221-231.
39. Genchi G., Carocci A., Lauria G., Sinicropi M.S., Catalano A., *Nickel. Human health and environmental toxicology*, Int. J. Environ. Res. Public Health, 17(3), 2020, s. 679, <https://doi.org/10.3390/ijerph17030679>.
40. Coetzee J.J., Bansal N., Chirwa E.M.N., *Chromium in environment, its toxic effect from chromite-mining and ferrochrome industries, and its possible bioremediation*, Expo. Heal., 12(1), 2020, s. 51-62, <https://doi.org/10.1007/s12403-018-0284-z>.
41. Su C., Jiang L., Zhang W., *A review on heavy metal contamination in the soil worldwide. Situation, impact and remediation techniques*, Environmental Skeptics and Critics, 3(2), 2014, s. 24-38.
42. Wang X., Sato T., Xing B., Tao S., *Health risks of heavy metals to the general public in Tianjin, China via consumption of vegetables and fish*, Sci. Total Environ., 350, 2005, s. 28-37.
43. Banu Z., Chowdhury S.A., Hossain D., Nakagami K., *Contamination and ecological risk assessment of heavy metal in the sediment of Turag river, Bangladesh. An index analysis approach*, J. Water Resour. Prot., 5(2), 2013, s. 239-248.

44. Mashiatullah A., Chaudhary M.Z., Ahmad N., Javed T., Ghaffar A., *Metal pollution and ecological risk assessment in marine sediments of Karachi Coast, Pakistan*, Environmental Monitoring and Assessment, 185, 2013, s. 1555-1565.
45. Valko M., Morris H., Cronin M.T.D., *Metals, toxicity and oxidative stress*, Curr. Med. Chem., 12, 2005, s. 1161-1208.
46. Friberg L., Kjellström T., Elinder C.-G., Nordberg G.F., *Cadmium and health. A toxicological and epidemiological appraisal*, t. 1: *Exposure, dose and metabolism*, United States, 2019, <https://doi.org/10.1201/9780429260599>.
47. Ali H., Khan E., Ilahi I., *Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous heavy metals. Environmental persistence, toxicity, and bioaccumulation*, J. Chem., 4, 2019, s. 1-14, <https://doi.org/10.1155/2019/6730305>.
48. Mitra S., Chakraborty A.J., Tareq A.M., Emran T.B., Nainu F., Khuroo A., Idris A.M., Khandaker M.U., Osman H., Alhumaydhi F.A., Simal-Gandara J., *Impact of heavy metals on the environment and human health. Novel therapeutic insights to counter the toxicity*, Journal of King Saud University – Science, 34(3), 2022, s. 101865, <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.101865>.
49. Branca J.J.V., Morucci G., Pacini A., *Cadmium-induced neurotoxicity. Still much ado*, Neural Regen. Res., 13, 2018, s. 1879-1882, <https://doi.org/10.4103/1673-5374.239434>.
50. Xiong Z., Xing C., Xu T., Yang Y., Liu G., Hu G., Cao H., Zhang C., Guo X., Yang F., *Vanadium induces oxidative stress and mitochondrial quality control disorder in the heart of ducks*, Front. Vet. Sci., 8, 2021, s. 756534.
51. Rauf A., Abu-Izneid T., Khalil A.A., Imran M., Shah Z.A., Emran T.B., Mitra S., Khan Z., Alhumaydhi F.A., Aljohani A.S.M., Khan I., Rahman M.M., Jeandet P., Gondal T.A., *Berberine as a potential anticancer agent. A comprehensive review*, Molecules, 26, 2021, s. 7368, <https://doi.org/10.3390/molecules26237368>.
52. Huang H.-W., Lee C.-H., Yu H.-S., *Arsenic-induced carcinogenesis and immune dysregulation*, Int. J. Environ. Res. Public Health, 16(15), 2019, s. 2746, <https://doi.org/10.3390/ijerph16152746>.
53. Yin Y., Meng F., Sui C., Jiang Y., Zhang L., *Arsenic enhances cell death and DNA damage induced by ultraviolet B exposure in mouse epidermal cells through the production of reactive oxygen species*, Clin. Exp. Dermatol., 44, 2019, s. 512-519, <https://doi.org/10.1111/ced.13834>.

Wpływ metali ciężkich na środowisko i człowieka

Streszczenie

Dynamiczny rozwój przemysłu, motoryzacji, nieracjonalne stosowanie środków ochrony roślin w rolnictwie oraz nieodpowiednie zagospodarowanie osadów ściekowych i odpadów przemysłowych przyczyniają się do nadmiernego przenikania pierwiastków śladowych do wód i gleb, co stanowi zagrożenie dla roślin, zwierząt i człowieka. Spośród pierwiastków śladowych coraz większe zainteresowanie – ze względu na ich negatywny wpływ na środowisko – budzą metale ciężkie.

W pracy przedstawiono źródła przenikania metali ciężkich do środowiska oraz przemieszczanie w łańcuchu troficznym człowieka. Stwierdzono, że metale ciężkie zanieczyszczające glebę hamują rozwój mikroorganizmów, co przyczynia się do zaburzenia ich podstawowych funkcji fizjologicznych, a przede wszystkim procesów dotyczących rozkładu i przemiany materii organicznej. Nadmierne ilości metali ciężkich negatywnie wpływają na podstawowe procesy życiowe roślin. Powodują zaburzenia fotosyntezy, podziału komórek, metabolizmu azotowego oraz gospodarki wodnej. Szkodliwość metali ciężkich wobec organizmów żywych (roślin, zwierząt, ludzi) polega na możliwości ich kumulowania w tkankach i powodowania chronicznej toksyczności. Skutki zdrowotne regularnego spożywania nawet śladowych ilości metali ciężkich mogą ujawnić się po wielu miesiącach, a nawet latach. Szczególnie wrażliwi na toksyczne działanie metali ciężkich są dzieci i ludzie chorzy.

Słowa kluczowe: metale ciężkie, zanieczyszczenie środowiska, toksyczność metali ciężkich, oddziaływanie na środowisko

Impact of heavy metals on the environment and human health

Abstract

The dynamic development of industry, motorization, irrational use of plant protection products in agriculture and inadequate management of sewage sludge and industrial waste contribute to the excessive penetration of trace elements into waters and soils, which is a threat to plants, animals and humans. Among these elements, heavy metals are becoming more and more popular due to their negative impact on the environment.

The paper presents the sources of heavy metals penetration into the environment and the movement in the human trophic chain. It was found that heavy metals polluting the soil inhibit the development of microorganisms, which contributes to the destruction of their basic physiological functions, and above all the processes of decomposition and transformation of organic matter. With excessive amounts, heavy metals negatively affect the basic life processes of plants. They cause disorders of photosynthesis, cell division, nitrogen metabolism and water management. In turn, the harmfulness of heavy metals to living organisms consists in the possibility of their accumulation in living tissues and causing chronic toxicity. The health effects of regular consumption of even trace amounts can manifest themselves after many months or even years. Children and sick people are particularly sensitive to the toxic effects of heavy metals.

Keywords: heavy metals, environmental pollution, heavy metal toxicity, environmental impact

Czwartorzędowe amoniowe pochodne monomeru uretanowo-dimetakrylanowego i ich polimery

1. Wprowadzenie

Stomatologiczne kompozytowe materiały rekonstrukcyjne (SKMR) należą obecnie do materiałów najczęściej stosowanych w stomatologii odtwórczej i zachowawczej. Wynika to z ich zadowalających właściwości użytkowych, wysokich walorów estetycznych oraz przystępności cenowej. Składają się z organicznej, dimetakrylanowej matrycy i nieorganicznych napelnaczy. Dimetakrylanowe matryce powstają przez kopolimeryzację różnych monomerów, głównie dimetakrylanu eteru diglicydydowego bisfenolu A (Bis-GMA) oraz jego pochodnych, monomeru uretanowo-dimetakrylanowego (UDMA) i dimetakrylanu glikolu trietylowego (TEGDMA) [1]. Mimo wielu zalet, SKMR nie zapewniają ochrony przed próchnicą wtórną, ponieważ wykazują jedynie znikomą aktywność antybakteryjną [2].

Zmodyfikowanie SKMR związkami bioaktywnymi w celu nadania im właściwości antybakteryjnych wydaje się racjonalnym rozwiązaniem problemu próchnicy wtórnej, gdyż stała się ona globalnym problemem w XXI wieku [3]. Możliwe są dwa sposoby takiej modyfikacji – fizyczny i chemiczny. Metoda pierwsza polega na wymieszaniu nieutwardzonego materiału ze związkami, które wykazują działanie antybakteryjne. Jej główną zaletą jest jej niski koszt. Jednak SKMR zmodyfikowane fizycznie nie wykazują długotrwałej stabilności właściwości fizykochemicznych, mechanicznych i biologicznych. Wynika to z tendencji do wymywania związków bioaktywnych – ze względu na brak ich kowalencyjnego związania z organiczną matrycą [4, 5]. Chemiczna modyfikacja SKMR polega na kopolimeryzacji dimetakrylanowej matrycy z bioaktywnymi monomerami metakrylanowymi, zazwyczaj posiadającymi czwartorzędowe grupy amoniowe. Dzięki trwałemu wbudowaniu związków bioaktywnych uzyskuje się SKMR o lepszych oraz stabilniejszych parametrach [6].

Czwartorzędowe związki amoniowe znane są z wysokiej aktywności antybakteryjnej. Wynika to z oddziaływania elektrostatycznego między dodatnio naładowanym atomem azotu a ujemnie naładowaną powierzchnią komórki bakteryjnej. W efekcie tego oddziaływania dochodzi do zaburzenia równowagi elektrostatycznej w ścianie komórki bakteryjnej, wzrostu ciśnienia osmotycznego w jej wnętrzu, uwolnienia jonów potasu oraz innych składników cytoplazmy odpowiedzialnych za prawidłowe funkcjonowanie komórki bakteryjnej, a finalnie – jej rozpadu [7].

Jako pierwsze otrzymano SKMR wzbogacone monometakrylanami z czwartorzędowymi grupami amoniowymi (QA-MMA). Wykazują one wysoką aktywność antybakte-

¹ patryk.drejka@polsl.pl, Katedra Fizykochemii i Technologii Polimerów, Wydział Chemiczny, Politechnika Śląska, 40-100 Gliwice, Polska.

² marta.chroszcz@polsl.pl, Katedra Fizykochemii i Technologii Polimerów, Wydział Chemiczny, Politechnika Śląska, 40-100 Gliwice, Polska.

³ izabela.barszczewska-rybarek@polsl.pl, Katedra Fizykochemii i Technologii Polimerów, Wydział Chemiczny, Politechnika Śląska, 40-100 Gliwice, Polska.

ryjną przeciw wielu szczepom bakterii, takim jak: *Streptococcus mutans*, *Actinomyces viscosus* oraz *Lactobacillus casei* [8-11]. Obecność QA-MMA przyczynia się jednak do spadku gęstości usieciowania w sieciach polimerowych tworzących utwardzone matryce SKMR. Skutkuje to wzrostem ich elastyczności, wodochłonności i wymywalności monomeru reszkowego [10, 11].

W nadziei na wyeliminowanie tego problemu opracowano dimetakrylany z czwartorzędownymi grupami amoniowymi (QA-DMA). Obecność dwóch grup metakrylanowych w cząsteczce monomeru teoretycznie zapewnia jej szansę wbudowania się w strukturę utwardzonych matryc oboma końcami [12]. SKMR wzbogacone QA-DMA również wykazują wysoką aktywność antybakteryjną przeciw dużej grupie szczepów bakteryjnych, takich jak: *S. mutans*, *A. viscosus*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus sanguinis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella melaninogenica*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* oraz *Bacillus subtilis* [13-18]. Dodatkowo wyniki badań pokazują, iż aktywność antybakteryjna SKMR posiadających matryce zmodyfikowane QA-DMA zależy jest od liczby czwartorzędownych grup amoniowych obecnych w ich cząsteczkach. Im wyższa jest liczba tych grup, tym wyższa jest aktywność antybakteryjna samej matrycy, jak i kompozytu. Z tego względu zbliżoną aktywność mikrobiologiczną kompozytów uzyskuje się stosując mniejszy udział wagowy QA-DMA posiadającego dwie czwartorzędowe grupy amoniowe (di-QA-DMA) niż QA-DMA posiadającego jedną czwartorzędowną grupę amoniową (mono-QA-DMA). Na tej podstawie można stwierdzić, że di-QA-DMA stanowią najbardziej obiecującą grupę monomerów bioaktywnych, które potencjalnie mogą zostać wykorzystane do chemicznej modyfikacji matryc SKMR w celu nadania im właściwości antybakteryjnych.

Ciekawą propozycją di-QA-DMA jest seria sześciu monomerów uretanowo-dimetakrylanowych (QAUDMA-n). Każdy z nich posiada rdzeń pochodzący od diizocyjanianu trimetyloheksmetyleny (TMDI) oraz dwa ramiona połączone z rdzeniem wiązaniem uretanowym. Każde z ramion zakończone jest grupą metakrylanową oraz posiada jedną czwartorzędowną grupę amoniową z podstawnikiem N-alkilowym: $-C_nH_{2n+1}$, gdzie n wynosi 8, 10, 12, 14, 16 lub 18. Grupa monomerów QAUDMA-n, odpowiednio: QAUDMA-8, QAUDMA-10, QAUDMA-12, QAUDMA-14, QAUDMA-16 i QAUDMA-18, jak i ich polimerów z TEGDMA została otrzymana i szeroko scharakteryzowana w literaturze w latach 2021-2022 [19-21].

Celem niniejszych badań literaturowych było zebranie aktualnej wiedzy na temat właściwości monomerów QAUDMA-n oraz ich kopolimerów, które mogą mieć potencjalne zastosowanie w stomatologicznych materiałach kompozytowych.

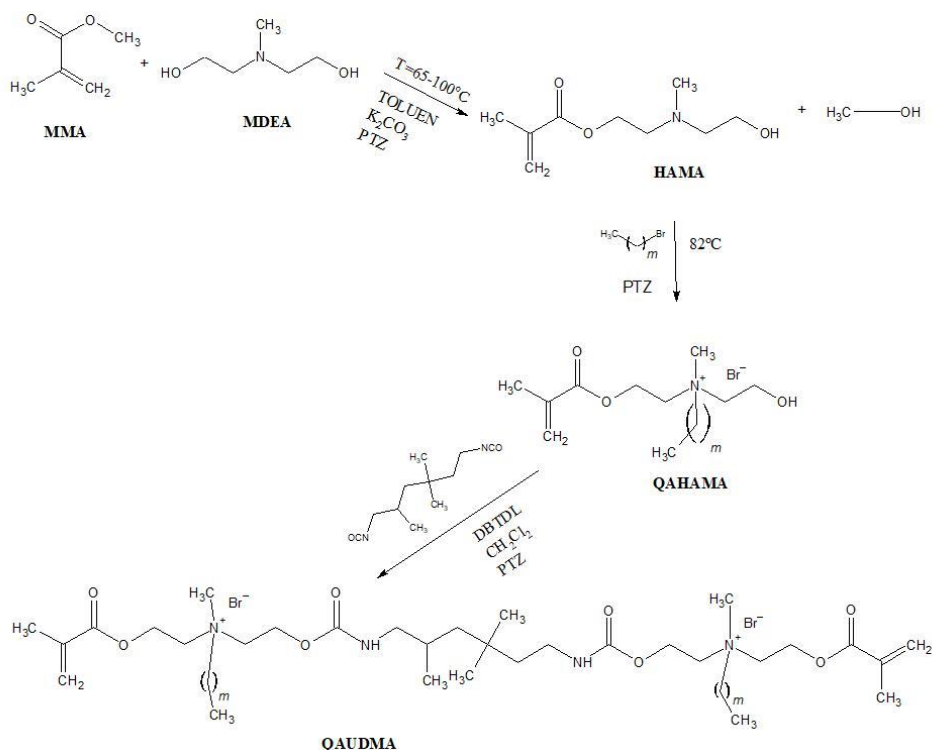
2. Synteza monomerów QAUDMA-n

Monomery QAUDMA-n otrzymuje się na drodze trzyetapowego procesu (rys. 1) [19]:

1. Transestryfikacja metakrylanu metylu (MMA) metylodietanoloaminą (MDEA) w stosunku molowym 1,2 : 1, prowadząca do otrzymania metakrylanu hydroksyloaminy (HAMA). Reakcję prowadzi się w obecności katalizatora (8% wag. węglanu potasu) w roztworze toluenu, w zakresie temperatur 65-100°C, przez 2,5 h, odbierając destylat złożony z mieszaniny azeotropowej MMA–metanol oraz toluenu.
2. Reakcja HAMA z bromkiem alkilowym ($C_nH_{2n+1}Br$, gdzie n – liczba atomów węgla – wynosi 8, 10, 12, 14, 16 lub 18) w stosunku molowym 1 : 1, prowadząca do otrzymania czwartorzędownej soli amoniowej (QAHAMA), tzw. reakcja Menshutkina.

Reakcję prowadzi się w temperaturze 82°C przez 82 h lub 168 h – w zależności od $C_nH_{2n+1}Br$ (dla n w przedziale 8-14 czas reakcji był krótszy niż dla n równego 16 i 18).

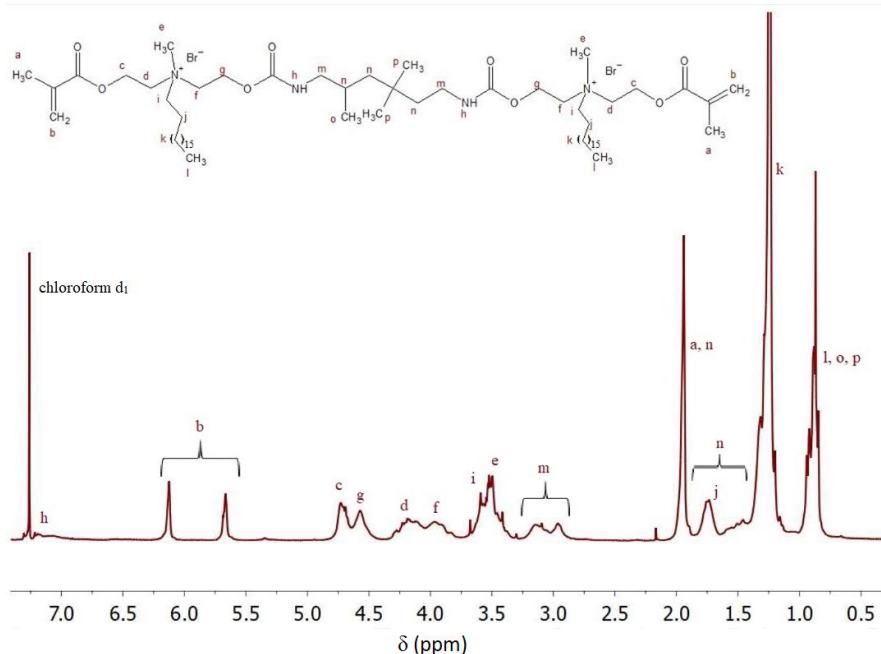
3. Addycja QAHEMA do TMDI w stosunku molowym 2 : 1, prowadząca do otrzymania QAUDMA- n . Reakcję prowadzi się w obecności katalizatora (0,03% wag. dilaurynianu dibutylocyny) w roztworze dichlorometanu, w temperaturze 42°C, przez 3 h. QAUDMA- n są wysokolepkimi cieczami o barwie jasnożółtej.



Rysunek 1. Synteza monomerów QAUDMA- n ($n = m + 1$; $m = 7-17$), opracowanie własne na podstawie [19]

3. Budowa chemiczna QAUDMA- n

Budowę chemiczną monomerów QAUDMA- n oraz produktów pośrednich ich syntezy potwierdzono technikami spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego 1H NMR i ^{13}C NMR oraz spektroskopii w podczerwieni (FTIR) [19]. Na przykładowym widmie 1H NMR monomeru QAUDMA-18 (rysunek 2) widoczne są sygnały świadczące o obecności grupy $>N^+(CH_3)(C_{18}H_{37})$ (3,42 ppm), grup podstawnika $-C_{18}H_{37}$: $-CH_3$ (0,87 ppm), $-(CH_2)_{15}-$ (1,17-1,43 ppm), $>N^+(CH_3)(CH_2)-(CH_2)-$ (1,77 ppm) oraz $>N^+(CH_3)(CH_2)-(CH_2)-$ (3,59 ppm), wiązania uretanowego $-NHCOO-$ (7,18 ppm), grup rdzenia TMDI: $-(CH_2)-NHCOO-$ (2,85-3,25 ppm), $-CH_2-$ i $-CH<$ (1,40-2,50 ppm), częściowo nakładające się z sygnałami protonów grup $-CH_2-$ należących do podstawnika $-C_{18}H_{37}$, $-CH_3$ (0,87-0,96 ppm, nakładające się sygnałami pochodzącymi od protonów grupy $-CH_3$ podstawnika $-C_{18}H_{37}$).



Rysunek 2. Widmo ^1H NMR monomeru QAUDMA-18, opracowanie własne na podstawie [19]

4. Właściwości monomerów

Jak pokazano w tabeli 1, monomery QAUDMA- n mają wysokie masy cząsteczkowe (około dwukrotnie wyższe niż Bis-GMA i UDMA i prawie czterokrotnie wyższe niż TEGDMA), które rosną wraz ze wzrostem długości podstawnika N-alkilowego. Znajduje to wyraz w malejących wartościach stężenia wiązań podwójnych (χ_{DB}) oraz uretanowych (χ_{UB}). Niskie wartości χ_{DB} oznaczają, że polimery QAUDMA- n będą miały niższe teoretyczne gęstości usieciowania niż polimery Bis-GMA, UDMA i TEGDMA [22]. Pozytywnym skutkiem niskich wartości χ_{DB} jest niski skurcz polimeryzacyjny monomerów QAUDMA- n (zarówno teoretyczny – S_t , jak i praktyczny – S). Wartość χ_{UB} informuje z kolei o gęstości usieciowania fizycznego, związanego z obecnością wiązań wodorowych tworzących fizyczne węzły sieci. Ze względu na obecność wiązania uretanowego polimery zawierające jednostki QAUDMA- n będą usieciowane fizycznie. Jednak gęstość takiego usieciowania będzie malała wraz ze wzrostem długości podstawnika N-alkilowego.

Monomery QAUDMA- n charakteryzują się lepkościami znacząco wyższymi od lepkości Bis-GMA, UDMA i TEGDMA. Przykładowo, lepkość Bis-GMA wyznaczona w 50°C jest trzy oraz cztery rzędy wielkości niższa niż lepkość monomerów QAUDMA- n . Sugeruje to, iż zastosowanie QAUDMA- n jako składników stomatologicznych spoiw dimetakrylanowych wymagać będzie wykorzystania rozpuszczalnika aktywnego, np. TEGDMA (wszystkie badane QAUDMA- n są rozpuszczalne w TEGDMA). Analiza lepkości w serii monomerów QAUDMA- n pokazuje, że zależy ona od długości podstawnika $-\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$. Jej wartość rośnie przy „ n ” o zakresie 8-12, a następnie maleje.

Tabela 1. Wartości parametrów charakteryzujących monomery QAUDMA-n: masa cząsteczkowa (MW), stężenie wiązań podwójnych (x_{DB}) oraz wiązań uretanowych (x_{UB}), skurcz polimeryzacyjny teoretyczny (S_t) i praktyczny (S), lepkość (η)

Monomer	MW [g/mol]	$x_{DB} = x_{UB}$ [mol/kg]	S_t [%]	S [%]	η^* [Pa · s]
Bis-GMA	512	3,90	10,11	4,72	$1,14 \times 10^{3**}$ 8,36
UDMA	470	4,25	10,65	2,33	9,54
TEGDMA	286	6,99	17,12	10,61	0,011
QAUDMA-8	970	2,06	5,56	1,24	$1,28 \times 10^3$
QAUDMA-10	1026	1,95	5,11	1,69	$1,39 \times 10^4$
QAUDMA-12	1082	1,85	4,69	2,25	$1,14 \times 10^4$
QAUDMA-14	1138	1,76	4,35	2,99	$3,18 \times 10^3$
QAUDMA-16	1194	1,68	4,09	1,99	$2,79 \times 10^3$
QAUDMA-18	1250	1,60	3,85	1,47	$3,33 \times 10^3$

* η wyznaczono w temperaturze 50°C** η wyznaczono w temperaturze 25°C

Źródło: opracowanie własne na podstawie [19].

Zależność podobną do zmian wartości lepkości w serii monomerów QAUDMA-n obserwuje się dla wartości T_{gm} wyznaczonych metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC). Przedstawia to tabela 2.

Tabela 2. Wartości parametrów charakteryzujących monomery QAUDMA-n: temperatura zeszklenia monomeru (T_{gm}), gęstość monomerów (d_m), współczynnik załamania światła (RI), stopień konwersji wyznaczony metodą FTIR (DC_{IR}) oraz DSC (DC_{DSC})

Monomer	T_{gm} [°C]	d_m [g/cm ³]	RI	DC_{IR} [%]	DC_{DSC} [%]
Bis-GMA	-7,31	1,150	1,5493	32,56	-
UDMA	-35,93	1,090	1,4614	78,92	-
TEGDMA	-83,74	1,070	1,4852	84,23	-
QAUDMA-8	-17,25	1,199	1,5161	60,39	61,36
QAUDMA-10	-16,38	1,166	1,5112	71,76	70,76
QAUDMA-12	-15,15	1,129	1,5080	73,35	71,64
QAUDMA-14	-22,39	1,101	1,5054	79,42	78,12
QAUDMA-16	-24,32	1,085	1,5005	74,79	74,27
QAUDMA-18	-31,01	1,070	1,5003	53,37	52,83

Źródło: opracowanie własne na podstawie [19].

Na podstawie wyników przedstawionych w tabelach 1 i 2 można wnioskować, że cząsteczki monomerów QAUDMA-10 oraz QAUDMA-12, dla których zarejestrowano najwyższe wartości η i T_{gm} , charakteryzują najsilniejsze oddziaływania międzycząsteczkowe. Z tego względu mogą one być gęściej upakowane niż ich pozostałe odpowiedniki. Wyniki gęstości monomerów QAUDMA-n (d_m) potwierdzają, iż zdolność do gęstszego

upakowania maleje wraz ze wzrostem długości łańcucha N-alkilowego (wartości d_m spadają, podczas gdy długość podstawnika rośnie) [19]. Wydłużenie podstawnika $-C_nH_{2n+1}$ powyżej $n = 12$ prawdopodobnie zwiększa oddalenie cząsteczek monomerów – spowodowane wzrostem rozmiarów podstawnika N-alkilowego oraz osłabieniem siły oddziaływań międzycząsteczkowych.

Monomery QAUDMA- n charakteryzują się przepuszczalnością światła zbliżoną do przepuszczalności szkliwa, o czym świadczą wartości współczynnika załamania światła (RI) w zakresie 1,46-1,55 (tabela 2) [23].

W tabeli 2 zestawiono również wartości stopnia konwersji (DC) w homopolimerach QAUDMA- n wyznaczone metodami FTIR oraz DSC [19]. Wyniki te pokazują, że DC rośnie wraz z wydłużaniem podstawnika $-C_nH_{2n+1}$, osiągając wartość maksymalną dla $n = 14$, a następnie maleje. Taki wynik sugeruje, iż podstawnik $-C_{14}H_{29}$ przyjmuje optymalną konformację, co skutkuje najwyższym DC . Biorąc pod uwagę kryteria jakościowe stawiane SKMR, można uznać, że stopnie konwersji w homopolimerach QAUDMA- n są zadowalająco wysokie. Wszystkie wartości DC przekraczają 50% i prawie wszystkie przekraczają również wartość 55% (z wyjątkiem QAUDMA-18, którego DC wynosi 53%). Wartość DC równa 50% informuje, że każda cząsteczka monomeru ma szansę wbudować się przynajmniej jednym końcem w strukturę powstałej sieci polimerowej, więc teoretycznie układ nie powinien zawierać frakcji wymywalnej [24]. Wartość DC równa 55% jest z kolei podyktowana względami praktycznymi. Wyniki badań nad wpływem DC na ścieralność sugerują, że taki stopień konwersji nie gwarantuje stabilnych i trwałych właściwości użytkowych SKMR użytego do wykonania rekonstrukcji [25].

5. Właściwości kopolimerów QAUDMA- n z TEGDMA

Pionierskie badania nad właściwościami polimerów zawierających jednostki QAUDMA- n przeprowadzono na serii sześciu kopolimerów, o składzie QAUDMA- n 60% wag. oraz TEGDMA 40% wag. (QAn : TEG). Kopolimery te scharakteryzowano pod kątem właściwości fizykochemicznych, mechanicznych oraz antybakteryjnych. W celach porównawczych scharakteryzowano kopolimer o składzie 60% wag. Bis-GMA oraz 40% wag. TEGDMA (BG : TEG).

5.1. Właściwości fizykochemiczne

W tabeli 3 zestawiono właściwości fizykochemiczne kopolimerów QAn : TEG [20, 21].

Tabela 3. Parametry fizykochemiczne kopolimerów QAn : TEG i BG : TEG: temperatura zeszklenia kopolimeru (T_{gp}), skurcz polimeryzacyjny teoretyczny (S_t) i praktyczny (S), stopień konwersji (DC), kąt zwilżania (WCA), wodochłonność (WS) oraz wymywalność (SL)

Kopolimer	S_t [%]	S [%]	DC [%]	T_{gp} [°C]	WCA [°]	WS [µg/mm ³]	SL [µg/mm ³]
BG : TEG	12,9	8,4	64,8	61,66	87,9	27,20	3,92
QA8 : TEG	10,4	6,6	84,2	60,52	82,1	148,31	52,39
QA10 : TEG	10,0	6,4	84,0	60,33	82,6	138,42	32,23
QA12 : TEG	9,7	6,5	86,0	63,18	84,4	130,67	24,21
QA14 : TEG	9,4	6,9	88,7	64,07	86,1	124,89	19,08
QA16 : TEG	9,2	6,5	87,1	65,03	94,7	121,21	15,41
QA18 : TEG	9,0	6,5	87,1	66,32	98,7	116,08	12,67

Źródło: opracowanie własne na podstawie [20, 21].

Skurcz polimerizacyjny teoretyczny (S_t) oraz eksperymentalny (S) kopolimerów QAn : TEG jest niższy niż kopolimerów BG : TEG. Jest to korzystne dla potencjalnego zastosowania kopolimerów QAn : TEG jako matrycy SKMR. Wiadomym jest bowiem, że im mniejszy skurcz, tym mniejsza jest szczelina brzeżna, która powstaje między wypełnieniem a tkanką zęba. Analiza wartości S_t w serii kopolimerów QAn : TEG pokazuje, że maleją one wraz ze wzrostem długości podstawnika N-alkilowego, a wartość S nie jest od tej długości zależna.

Kopolimery QAn : TEG charakteryzują się bardzo wysokimi stopniami konwersji (DC), wyższymi niż kopolimery BG : TEG, a nawet homopolimer TEGDMA ($DC_{TEGDMA} = 84,2\%$) [19]. Wydłużanie podstawnika N-alkilowego nie ma negatywnego wpływu na DC , o czym świadczy rosnąca wartość DC . Można to przypisać skłębionej konformacji łańcucha podstawnika N-alkilowego. Nieznaczny spadek DC zaobserwowano dla polimerów QA16 : TEG i QA18 : TEG, co uwidacznia wpływ największych rozmiarów podstawników: $-C_{16}H_{33}$ i $-C_{18}H_{37}$.

Temperatura zeszklenia (T_{gp}) kopolimerów QAn : TEG rośnie wraz ze wzrostem długości podstawnika N-alkilowego w QAUDMA-n, a jej minimalna wartość wynosi $60,52^\circ\text{C}$. Uzyskany wynik sugeruje, że w zakresie temperatur panujących w jamie ustnej kopolimery QAn : TEG będą występowały w stanie szklistym i zachowują stałość właściwości mechanicznych [26].

Kąt zwilżania (WCA) kopolimerów QAn : TEG zależy od długości podstawnika N-alkilowego. Im jest on dłuższy, tym wyższa jest wartość WCA , czyli zanika charakter hydrofilowy powierzchni. Powierzchnie kopolimerów QAn : TEG z „n” w zakresie 8-14 wykazują charakter hydrofilowy (ich wartości WCA są niższe niż 90°), o czym prawdopodobnie decyduje obecność dwóch czwartorzędowych atomów azotu w strukturze QAUDMA-n. Z kolei kopolimery QA16 : TEG i QA18 : TEG charakteryzują się wartościami WCA wyższymi niż 90° , co odpowiada powierzchniom hydrofobowym [27]. W tym przypadku prawdopodobnie decydujące znaczenie ma długość hydrofobowego podstawnika N-alkilowego.

Kopolimery QAn : TEG charakteryzują się wysoką wodochłonnością (WS) oraz wymywalnością w wodzie (SL). Mimo że wartości WS oraz SL maleją wraz ze wzrostem długości podstawnika N-alkilowego, wszystkie przekraczają limity wskazane w normie ISO 4049, odpowiednio $40\text{ }\mu\text{g}/\text{mm}^3$ i $7,5\text{ }\mu\text{g}/\text{mm}^3$. Głównym czynnikiem wpływającym na wysoką WS i SL kopolimerów QAn : TEG jest obecność dwóch czwartorzędowych grup amoniowych w strukturze QAUDMA-n. Wiąże się z tym wysokie powinowactwo do wody – ułatwiające jej wchłanianie przez polimer oraz wymywanie frakcji nieusieciowanej. Duża ilość wody zaabsorbowanej przez SKMR, jak i obecność frakcji wymywalnej, jest zawsze niekorzystna, ponieważ destabilizuje jego właściwości fizykochemiczne, mechaniczne i biologiczne [28, 29].

5.2. Właściwości mechaniczne

W tabeli 4 zestawiono właściwości mechaniczne kopolimerów QAn : TEG: twardość (HB), wytrzymałość na zginanie (FS) oraz moduł sprężystości (E) [21].

Kopolimery QAn : TEG charakteryzują się mniejszą twardością, wytrzymałością na zginanie oraz sztywnością niż kopolimery BG : TEG. W przypadku HB i FS są to wartości niższe o około połowę, a w przypadku E o około trzy czwarte. Taki wynik można wytłumaczyć niższą gęstością usieciowania kopolimerów QAn : TEG w porównaniu do

BG : TEG, a także obecnością podstawników N-alkilowych w jednostce powtarzalnej QAUDMA-n, które są odpowiedzialne za rozsuwanie łańcuchów w sieci polimerowej tworzącej kopolimery QAn : TEG. Uzyskane parametry mechaniczne kopolimerów QAn : TEG są niewystarczające do ich zastosowania jako matryc SKMR, ponieważ nie są w stanie zapewnić odpowiednio wysokiej odporności SKMR na siły generowane w trakcie żucia.

Tabela 4. Parametry mechaniczne kopolimerów QAn : TEG i Bis-GMA: twardość (HB), wytrzymałość na zginanie (FS) oraz moduł sprężystości (E)

Kopolimer	HB [MPa]	FS [MPa]	E [MPa]
BG : TEG	107,56	51,63	2800,9
QA8 : TEG	51,41	21,59	679,0
QA10 : TEG	51,17	37,37	851,6
QA12 : TEG	50,87	34,46	848,7
QA14 : TEG	41,60	28,38	772,3
QA16 : TEG	41,21	20,13	753,5
QA18 : TEG	42,17	21,75	459,4

Źródło: opracowanie własne na podstawie [21].

Analizując zmiany wartości HB, FS i E w serii kopolimerów QAn : TEG można stwierdzić, że początkowo rosną, osiągając maksimum dla kopolimerów QA12:TEG, a następnie maleją. Oznacza to, że właściwości mechaniczne kopolimerów QAn : TEG są mocno uzależnione od siły oddziaływań międzycząsteczkowych zdefiniowanych właściwościami strukturalnymi podstawnika N-alkilowego.

5.3. Właściwości antybakteryjne

Aktywność antybakteryjną kopolimerów QAn : TEG wyznaczono względem bakterii gram-dodatnich *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 oraz gram-ujemnych *Escherichia coli* ATCC 25922 [20]. Jest ona znacząco wyższa w porównaniu do kopolimerów BG : TEG w badaniach przeciwko obu analizowanym szczepom. Aktywność antybakteryjna kopolimerów QAn : TEG przeciwko bakteriom *S. aureus* i *E. coli* rośnie wraz ze wzrostem długości podstawnika N-alkilowego w zakresie n wynoszącym 8-14 atomów węgla, a następnie maleje. Najlepsze wyniki w badaniach przeciwko *S. aureus* uzyskano dla QA14 : TEG, gdzie na powierzchni próbki nie zaobserwowano żadnych bakterii. Satysfakcjonujące wyniki dają również kopolimery QA12 : TEG, na powierzchni których występowały bakterie *S. aureus* w ilości mniejszej o sześć rzędów wielkości w porównaniu do BG : TEG. Bakterie *E. coli* zaobserwowano jedynie na powierzchniach kopolimerów QA16 : TEG oraz QA18 : TEG. Na powierzchniach kopolimerów QAn : TEG z krótszymi podstawnikami $-C_nH_{2n+1}$ ($n = 8-14$) nie stwierdzono obecności bakterii. Wpływ długości podstawnika N-alkilowego na właściwości antybakteryjne ma kluczowe znaczenie dla związków z czwartorzędową grupą amoniową. Najwyższą aktywność przeciwbakteryjną uzyskuje się, gdy ma on długość zbliżoną do długości łańcuchów lipidowych budujących ściany komórkowe bakterii, czyli w zakresie n 8-14 [30].

W ramach badań nad aktywnością biologiczną kopolimerów QAn : TEG zbadano również strefę inhibicji wzrostu bakterii [21]. Jej średnice malały wraz ze wzrostem długości łańcucha podstawnika N-alkilowego w QAUDMA-n. W badaniach przeciwko *S. aureus*, jak i *E. coli* największą sferą inhibicji charakteryzowały się QA8 : TEG.

6. Podsumowanie

Żywice QAUDMA-n stanowią ciekawą propozycję do stosowania jako bioaktywne komonomery w matrycach SKMR. Ich kopolimery z TEGDMA (QAn : TEG), opisane w literaturze, wykazują wysoką aktywność antybakteryjną, mają wysoki stopień konwersji, niski skurcz polimerizacyjny oraz odpowiednio wysoką temperaturę zeszklenia. Jednak ich właściwości mechaniczne oraz duże powinowactwo do wody ograniczają ich zastosowanie.

Literatura

1. Powers J.M., Sakaguchi R.L., *Restorative materials – composites and polymers*, [w:] *Craig's restorative dental materials*, Elsevier Mosby, St. Louis 2013.
2. Zhang N., Melo M.A.S., Weir M.D., Reynolds M.A., Bai Y., Xu H.H.K., *Do dental resin composites accumulate more oral biofilms and plaque than amalgam and glass ionomer materials?*, *Materials*, 9(11), 2016, s. 888.
3. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240061484> [data dostępu: 12.12.2022].
4. Song W., Ge S., *Application of antimicrobial nanoparticles in dentistry*, *Molecules*, 24, 2019, s. 1033.
5. Chrószcz M., Barszczewska-Rybarek I., *Nanoparticles of quaternary ammonium poly-ethylenimine derivatives for application in dental materials*, *Polymers*, 12, 2020, s. 2551.
6. Makvandi P., Jamaledin R., Jabbari M., Nikfarjam N., Borzacchiello A., *Antibacterial quaternary ammonium compounds in dental materials. A Systematic review*, *Dental Materials*, 34, 2018, s. 851-867.
7. Tashiro T., *Antibacterial and Bacterium Adsorbing Macromolecules*, *Macromolecular Materials and Engineering*, 286, 2001, s. 63-87.
8. Imazato S., Kinomoto Y., Tarumi H., Ebisu S., Tay F.R., *Antibacterial Activity and Bonding Characteristics of an Adhesive Resin Containing Antibacterial Monomer MDPB*, *Dental Materials*, 19, 2003, s. 313-319.
9. Li F., Weir M.D., Xu H.H.K., *Effects of quaternary ammonium chain length on antibacterial bonding agents*, *Journal of Dental Research*, 92, 2013, s. 932-938.
10. Vidal M.L., Rego G.F., Viana G.M., Cabral L.M., Souza J.P.B., Silikas N., Schneider L.F., Cavalcante L.M., *Physical and chemical properties of model composites containing quaternary ammonium methacrylates*, *Dental Materials*, 34, 2018, s. 143-151.
11. Cherchali F.Z., Mouzali M., Tommasino J.B., Decoret D., Attik N., Aboulleil H., Seux D., Grosgeat B., *Effectiveness of the DHMAI monomer in the development of an antibacterial dental composite*, *Dental Materials*, 33, 2017, s. 1381-1391.
12. Huang L., Yu F., Sun X., Dong Y., Lin P.T., Yu H.H., Xiao Y.H., Chai Z.G., Xing X.D., Chen J.H., *Antibacterial activity of a modified unfilled resin containing a novel polymerizable quaternary ammonium salt MAE-HB*, *Scientific Reports*, 6, 2016, s. 33858.
13. Huang L., Xiao Y.H., Xing X.D., Li F., Ma S., Qi L.L., Chen J.H., *Antibacterial activity and cytotoxicity of two novel cross-linking antibacterial monomers on oral pathogens*, *Archives of Oral Biology*, 56, 2011, s. 367-373.
14. Makvandi P., Ghaemy M., Mohseni M., *Synthesis and characterization of photo-curable bis-quaternary ammonium dimethacrylate with antimicrobial activity for dental restoration materials*, *European Polymer Journal*, 74, 2016, s. 81-90.
15. Yanwei Y., Li H., Yan D., Hongchen Z., Wei Z., Jinghao B., Jingjing W., Yan L., Jing G., Jihua C., *In vitro antibacterial activity of a novel resin-based pulp capping material containing the quaternary ammonium salt MAE-DB and Portland cement*, *PLoS ONE*, 9, 2014, s. 112549.

16. Antonucci J.M., Zeiger D.N., Tang K., Lin-Gibson S., Fowler B.O., Lin N.J., *Synthesis and characterization of dimethacrylates containing quaternary ammonium functionalities for dental applications*, Dental Materials, 28, 2012, s. 219-228.
17. Liang X., Huang Q., Liu F., He J., Lin Z., *Synthesis of novel antibacterial monomers (UDMQA) and their potential application in dental resin*, Journal of Applied Polymer Science, 129, 2013, s. 3373-3381.
18. Huang Q., Lin Z., Liang X., Liu F., He J., *Preparation and characterization of antibacterial dental resin with UDMQA-12*, Advances in Polymer Technology, 33, 2014, s. 21395.
19. Chrószcz M.W., Barszczewska-Rybarek I.M., *Synthesis and characterization of novel quaternary ammonium urethane-dimethacrylate monomers. A pilot study*, International Journal of Molecular Sciences, 22, 2021, s. 8842.
20. Chrószcz M.W., Barszczewska-Rybarek I.M., Kazez-Kęsik A., *Novel antibacterial copolymers based on quaternary ammonium urethane-dimethacrylate analogues and triethylene glycol dimethacrylate*, International Journal of Molecular Sciences, 23, 2022, s. 4954.
21. Chrószcz-Porebska M.W., Barszczewska-Rybarek I.M., Chladek G., *Characterization of the mechanical properties, water sorption, and solubility of antibacterial copolymers of quaternary ammonium urethane-dimethacrylates and triethylene glycol dimethacrylate*, Materials, 15, 2022, s. 5530.
22. Barszczewska-Rybarek I.M., *A guide through the dental dimethacrylate polymer network structural characterization and interpretation of physico-mechanical properties*, Materials, 12, 2019, s. 4057.
23. Manappallil J.J., *Basic Dental Materials*, Jaypee Brothers Medical Publishers, New Delhi (India) 2015.
24. Lovell L.G., Berchtold K.A., Elliot J.E., Lu H., Bowman Ch.N., *Understanding the kinetics and network formation of dimethacrylate dental resins*, Polymers for Advances Technologies, 12, 2001, s. 335-345.
25. Ferracane J.L., Mitchem J.C., Condon J.R., Todd R., *Wear and marginal breakdown of composites with various degrees of cure*, Journal of Dental Research, 76, 1997, s. 1508-1516.
26. Moraes J.C.S., Sostena M.M.D.S., Grandini C.R., *The glass transition temperature in dental composites*, Metal, Ceramic and Polymeric Composites for Various Uses, 2011, s. 669-684.
27. Purkait M.K., Sinha M.K., Mondal P., Singh R., *Photoresponsive membranes*, Interface Science and Technology, 25, 2018, s. 115-144.
28. Al-Bader R.M., Ziadon K.M., Al-Ajely M.S., *Water adsorption characteristics of new dental composites*, International Journal of Medical Research and Health Sciences, 4, 2015, s. 281.
29. Kumar N., Sangi L., *Water sorption, solubility, and resultant change in strength among three resin-based dental composites*, Journal of Investigative and Clinical Dentistry, 5, 2014, s. 144-150.
30. Balgavý P., Devinsky F., *Cut-off effects in biological activities of surfactants*, Advances in Colloid and Interface Science, 66, 1996, s. 23-63.

Czwartorzędowe amoniowe pochodne monomeru uretanowo-dimetakrylanowego i ich polimery

Streszczenie

Celem przeprowadzonych badań literaturowych było zebranie informacji dotyczących monomerów uretanowo-dimetakrylanowych posiadających czwartorzędowe grupy amoniowe (QAUDMA) o potencjalnym zastosowaniu jako składnik matryc stomatologicznych kompozytowych materiałów rekonstrukcyjnych (SKMR). QAUDMA składają się z rdzenia diizocyjanianu 2,4,4-trimetyloheksametyleny, do którego wiązaniem uretanowym przyłączone są ramiona posiadające czwartorzędową grupę amoniową podstawioną łańcuchem N-

alkilowym o długości od 8 do 18 atomów węgla i zakończone grupą metakrylanową. QAUDMA charakteryzowały się bardzo dobrymi parametrami fizykochemicznymi. Jednak ze względu na zbyt wysoką lepkość QAUDMA – nie mogą one być stosowane jako samodzielny składnik matrycy SKMR. Dlatego w dalszych badaniach otrzymano ich kopolimery z dimetakrylanem glikolu trietylenowego (TEGDMA). Zaletami tych kopolimerów były zadowalające parametry fizykochemiczne i wysoka aktywność antybakteryjna. Jednak niskie właściwości mechaniczne i wysokie powinowactwo do wody były ich wadami.

QAUDMA są interesującym rozwiązaniem w dziedzinie stomatologii ze względu na odpowiednie właściwości fizykochemiczne oraz wysoką aktywność antybakteryjną ich kopolimerów z TEGDMA. Pomimo tego, iż wspomniane kopolimery wykazywały niskie parametry mechaniczne oraz dużą wodorochłonność, prowadzenie dalszych badań opartych na kopolimerach QAUDMA z innymi handlowymi monomerami stomatologicznymi jest warte uwagi.

Słowa kluczowe: uretano-dimetakrylany, fotoutwardzalne żywice stomatologiczne, czwartorzędowe grupy amoniowe

Quaternary ammonium derivatives of urethane-dimethacrylate monomer and its polymers

Abstract

Literature research aimed to gather information concerning urethane-dimethacrylate monomers, which possess quaternary ammonium groups (QAUDMA) and have potential application in stomatology as a component of matrices in composite reconstructive materials.

QAUDMA consists of a 2,4,4-trimethylhexamethylene diisocyanate core and two wings, possessing a quaternary ammonium group, substituted with an N-alkyl chain of 8 to 18 carbon atoms and terminated with a methacrylate group. QAUDMAs were characterized by very good physicochemical properties. However, due to their high viscosity, QAUDMAs cannot be used as a standalone component of dental reconstructive materials. Therefore in further research their copolymers with triethylene glycol dimethacrylate (TEGDMA) were prepared. Advantages of these copolymers were satisfying physicochemical properties and high antibacterial activity. However, their low mechanical properties and high-water affinity were their disadvantages.

QAUDMAs may be an interesting solution in the field of stomatology, due to their adequate physicochemical properties and high antibacterial activity of their copolymers with TEGDMA. Despite the low mechanical properties and high-water sorption of previously mentioned copolymers, further research of QAUDMAs's copolymers with other commercial dental monomers are worth attention.

Keywords: urethane-dimethacrylates, photocurable dental resins, quaternary ammonium groups

Charakterystyka mineralogiczno-chemiczna żużli hutniczych po przeróbce rud Zn-Pb ze zwałowisk w Wirku i Bykowinie (Ruda Śląska)

1. Wprowadzenie

Górny Śląsk – z uwagi na bogactwo złóż kopalin – już od czasów wczesnego średniowiecza stanowił jeden z najbardziej rozwiniętych regionów w Polsce. Obok przemysłu wydobywczego węgla kamiennego istotną rolę w rozwoju regionu odegrała eksploatacja i przeróbka rud metali, w tym rud Zn-Pb.

Rozwijający się przemysł z jednej strony był czynnikiem rozwojowym Górnego Śląska, z drugiej – przyczynił się do degradacji środowiska. Ekspansywnej działalności górniczej i hutniczej towarzyszyło powstawanie znacznej ilości odpadów. Szczególnie niebezpieczne dla środowiska były (i nadal są) odpady po przetopie rudy. Odpady hutnicze, na które składają się przede wszystkim żużle, gromadzono na zwałowiskach przez wiele lat bez pomysłu na ich wtórne wykorzystanie.

Odpady hutnicze Zn-Pb zalicza się do odpadów o wysokim stopniu toksyczności przede wszystkim z uwagi na zawarte w nich znaczne ilości metali ciężkich [1], które w warunkach kwaśnego odczynu środowiska mogą migrować do otoczenia, przyczyniając się do zanieczyszczenia gleby i wód [2]. Z tego powodu zwałowiska odpadów hutniczych powinny być całkowicie odizolowane od środowiska [3], niestety w większości przypadków nie jest to przestrzegane. W śląskich miastach – często w bezpośrednim sąsiedztwie zabudowań mieszkalnych – znajdują się zwałowiska będące pozostałością po działalności hut z ubiegłych stuleci, a także zwałowiska powstałe w pobliżu działających obecnie lub niedawno zamkniętych hut i zakładów metali nieżelaznych [4, 5].

Lokalizację zewidencjonowanych zwałowisk odpadów po hutnictwie rud Zn-Pb na Górnym Śląsku i w rejonie olkuskim przedstawia tabela 1, jednak zestawienie zwałowisk odpadów ujętych w tabeli nie zamyka listy tych obiektów. Oprócz zinwentaryzowanych zwałowisk odpadów hutniczych istnieje wiele takich, które nie zostały zewidencjonowane. Ich kontury są zatarte w wyniku postępowania procesów wietrzenia oraz działalności antropogenicznej, trudno jest więc ustalić ich granice [6]. Miejsca historycznej eksploatacji można identyfikować np. metodami analizy geograficznej, jednak jest to trudne zadanie i możliwe wtedy, gdy w morfologii terenu zaznaczają się formy krajobrazu charakterystyczne dla składowania odpadów [7].

¹ iwona.jonczy@polsl.pl, Katedra Mechanizacji i Robotyzacji Górnictwa, Wydział Górnictwa, Inżynierii Bezpieczeństwa i Automatyki Przemysłowej, Politechnika Śląska, <https://www.polsl.pl/rg/>.

² krzysztof.filipowicz@polsl.pl, Katedra Mechanizacji i Robotyzacji Górnictwa, Wydział Górnictwa, Inżynierii Bezpieczeństwa i Automatyki Przemysłowej, Politechnika Śląska, <https://www.polsl.pl/rg/>.

Tabela 1. Wykaz zwałowisk odpadów hutniczych po przeróbce rud Zn-Pb zewidencjonowanych na Górnym Śląsku i w rejonie olkuskim

Gmina	Zwałowiska
Bolesław	<ul style="list-style-type: none">• Hałda Michalska ZGH „Bolesław”• zwałowisko na terenie ZGH „Bolesław”
Bytom	<ul style="list-style-type: none">• 4 zwałowiska odpadów poflotacyjnych ZGH „Orzeł Biały”• zwałowisko Zakładów Cynkowych „Silesia”
Katowice	<ul style="list-style-type: none">• zwałowisko szlamów cynkonośnych oraz żużli hutniczych Huty Metali Nieżelaznych „Szopienice”• 2 zwałowiska odpadów przemysłowych Zakładów Metalurgicznych „Silesia”
Miasteczko Śląskie	<ul style="list-style-type: none">• zwałowisko żużli z pieców przewałowych Huty Cynku „Miasteczko Śląskie”
Piekary Śląskie	<ul style="list-style-type: none">• zwałowisko W/H/68 ZGH „Orzeł Biały”• zwałowisko odpadów popłuczkowych i hutniczych W/H/69 ZGH „Orzeł Biały”• zwałowisko żużla hutniczego ZGH „Orzeł Biały” przy dawnym ZGH „Waryński”• zwałowisko odpadów hutniczych O/H/81 ZGH „Orzeł Biały”
Ruda Śląska	<ul style="list-style-type: none">• 4 zwałowiska żużli hutniczych pochodzące z XIX wieku
Świętochłowice	<ul style="list-style-type: none">• zwałowiska odpadów Zn-Pb Zakładów Cynkowych „Silesia” zlokalizowane w: Lipinach (5 zwałowisk), przy ul. Ceramicznej (1 zwałowisko)
Trzebinia	<ul style="list-style-type: none">• zwałowisko Zakładów Metalurgicznych „Trzebinia”

Źródło: [3].

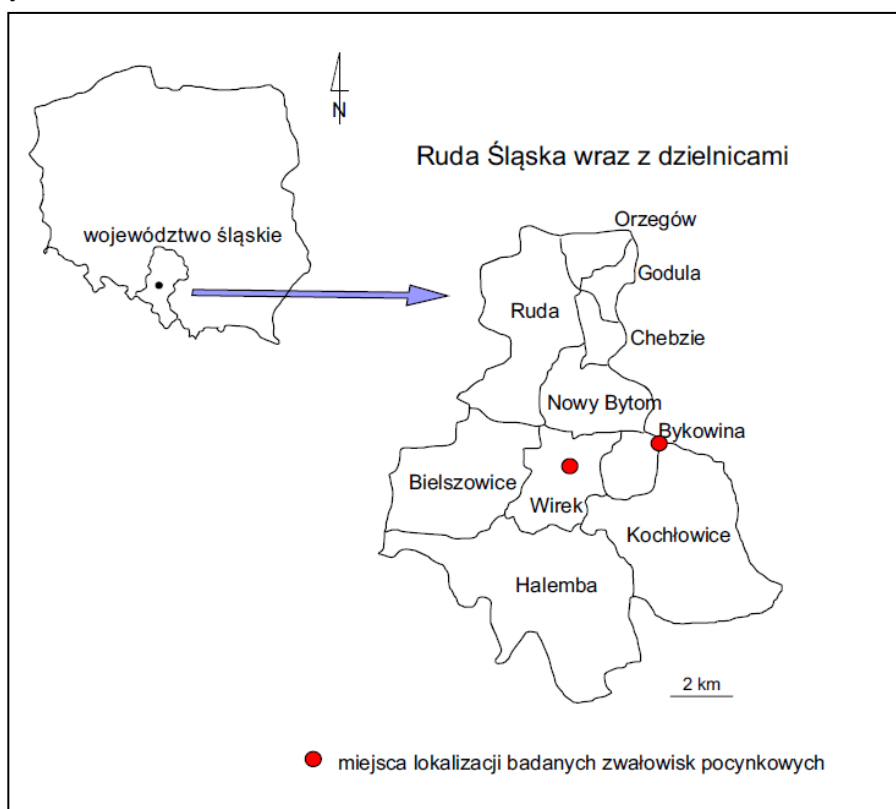
Przykładem jednego z najstarszych ośrodków rozwoju przemysłu Zn-Pb są tereny zajmowane przez dzisiejsze miasto Ruda Śląska. Rudy metali eksploatowano tu już od wczesnego średniowiecza, jednak rozkwit osady miał miejsce na przełomie XVIII i XIX wieku [8-11]. Z tego też okresu pochodzą pozostawione na terenie miasta 4 zwałowiska odpadów po przeróbce rud Zn-Pb. Na 2 z nich przeprowadzono prace rekultywacyjne związane z wykonaniem obudowy biologicznej oraz wkomponowaniem terenu zajmowanego przez zwałowiska w otaczający krajobraz. Pozostałe 2 nadal są niezabezpieczone, ich odsłonięte skarpy oraz powierzchnia są stale narażone na oddziaływanie czynników zewnętrznych, co jest przyczyną zachodzenia procesów prowadzących do przeobrażeń składników zawartych w żużlach. Zwałowiska są zlokalizowane w dzielnicach Rudy Śląskiej – Wirek i Bykowina, w centrum obszarów zurbanizowanych, przez co stanowią szczególne zagrożenie dla otoczenia. Badania żużli ze zwałowiska w Wirku prowadzone były przez Autorów już wcześniej [12], natomiast w 2022 roku pobrano próbki żużli ze zwałowiska w Bykowinie. Celem podjętych badań była charakterystyka żużli Zn-Pb zgromadzonych na obydwu zwałowiskach w aspekcie ich składu mineralogiczno-chemicznego oraz pod względem procesów zachodzących w zwałowiskach.

2. Niezagospodarowane zwałowiska pocynkowe w Rudzie Śląskiej

Nazwa miejscowości „Ruda Śląska” po raz pierwszy pojawiła się w bulli papieża Adriana IV z 1155 roku, natomiast w Rejestrze Ujazdowskim z Księgi uposażeń biskupstwa wrocławskiego (ok. 1305) Ruda Śląska została wymieniona jako miejscowość, w której swoją siedzibę miał sołtys i w której znajdował się młyn. Obszar miasta obejmo-

wał wówczas 50 włók, czyli 1220 ha. Rozwój przemysłu cynkowego w Rudzie Śląskiej, podobnie jak na całym obszarze Górnego Śląska, miał miejsce w XVIII i XIX wieku, co związane było z zastosowaniem coraz bardziej nowoczesnych technologii wydobywania, które pozwoliły na eksploatację zalegających na większych głębokościach rud siarczko-
wych. Bogata w siarczki cynku i ołowiu kopalina stała się podstawą funkcjonowania licznie powstających na terenie miasta cynkowni. Były to m.in. cynkownie: Miłość, Karol, Godula, Hugo, Zorza Poranna, Dobra Nadzieja, Rozamunda. Początki ich działalności są datowane na lata 1812-1842, większość z nich pracowała do lat 30. XX wieku. Pozostałością po ich funkcjonowaniu są zwałowiska odpadów [8-11].

Niezagospodarowane zwałowiska pocynkowe na obszarze Rudy Śląskiej przedstawia rysunek 1.



Rysunek 1. Granice administracyjne Rudy Śląskiej wraz z lokalizacją niezagospodarowanych zwałowisk pocynkowych (opracowanie własne)

Na terenie dzielnic Rudy Śląskiej – Wirek oraz Bykowina – znajdują się 2 niezagospodarowane zwałowiska stanowiące relikty historii przemysłu cynkowego z XIX wieku.

2.1. Zwałowisko przy ulicy Nowary w dzielnicy Wirek

Na początku XIX wieku na terenie dzisiejszego Wirka zaczął powstawać ważny ośrodek przemysłowy. W pierwszej kolejności z inicjatywy Łazarza III Henckel von Donnersmarcka w 1805 roku uruchomiono hutę żelaza „Antonina”, a w 1812 roku w jej sąsiedztwie powstała huta cynku „Hugo”, która jako zakład produkcyjny funkcjonowała

do 1932 roku [9, 13]. W chwili obecnej większość zabudowań huty została rozebrana, a teren dawniej przez nią zajmowany porastają drzewa (rys. 2). Do pozostałości po zabudowaniach huty przylega zwałowisko odpadów zajmujące powierzchnię 8,5 ha (rys. 3).



Rysunek 2. Pozostałość po zabudowaniach huty Hugo (fot. I. Jonczy)



Rysunek 3. Zwałowisko odpadów pocynkowych po działalności huty Hugo (fot. I. Jonczy)

2.2. Zwałowisko w Bykowninie

Zwałowisko położone jest we wschodniej części miasta Ruda Śląska w dzielnicy Bykowina, od wschodu zwałowisko przylega do granicy Rudy Śląskiej ze Świętochłowicami, zajmuje powierzchnię około 6 ha (rys. 4). Osada Bykowina do końca XVII wieku była przysiółkiem Kochłowic – do momentu, gdy Donnersmarck na jej dzisiejszym obszarze założył wieś o pierwotnej nazwie Dębowa Kłoda, później nazwaną Bykowiną. W 1950 roku Bykowinę przyłączono do miasta Nowy Bytom, a w 1959 roku – jako dzielnicę – do Rudy Śląskiej. Zgromadzony na zwałowisku materiał opadowy stanowi pozostałość po działającej w tym rejonie w latach 1876-1929 hucie cynku „Franz”, którą w okresie międzywojennym przekształcono w fabrykę porcelany [14].



Rysunek 4. Zwałowisko odpadów pocynkowych w Bykowie (fot. A. Bartela)

3. Materiał badawczy i metody badań

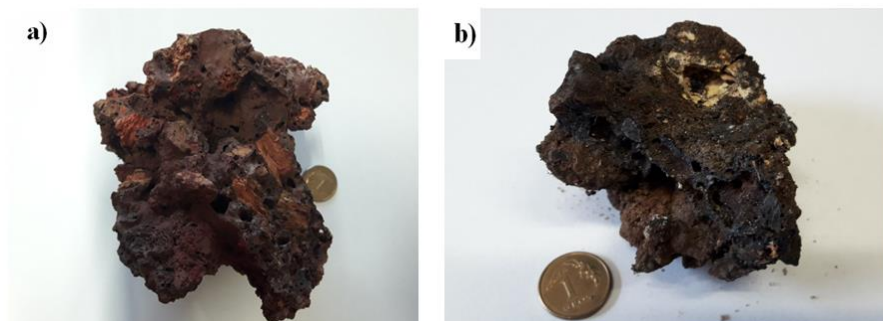
Badania żużli Zn-Pb ze zwałowiska w Wirku prowadzono w latach 2006-2019, natomiast odpadów ze zwałowiska w Bykowie w roku 2022. Opróbowanie poprzedziły obserwacje terenowe. W odsłoniętych skarpach zwałowisk wyróżniono miejsca nagromadzenia żużli o zróżnicowanych cechach makroskopowych związanych z ich barwą, strukturą i teksturą. Ta wyraźna różnorodność stała się podstawą do pobrania 50 próbek ze zwałowiska w Wirku oraz 20 próbek ze zwałowiska w Bykowie. Do badań laboratoryjnych wytypowano 20 próbek ze zwałowiska w Wirku oraz 10 próbek ze zwałowiska w Bykowie.

Metodyka badań żużli hutniczych obejmowała następujące oznaczenia:

- analizy składu fazowego opierające się na obserwacjach mikroskopowych w świetle przechodzącym i odbitym przy wykorzystaniu mikroskopu polaryzacyjnego wyposażonego w analizator obrazu, a także obserwacje przy zastosowaniu mikroskopii elektronowej skaningowej. Dodatkowo skład fazowy żużli był weryfikowany przez wyniki badań uzyskane metodą dyfrakcji rentgenowskiej (XRD);
- analizy składu chemicznego żużli przy wykorzystaniu technik ICP oraz XRF, a także oznaczenia zawartości SiO_2 metodą stapiania z topnikiem alkalicznym (Na_2CO_3);
- ocenę wybranych właściwości fizykomechanicznych: porowatości całkowitej na podstawie gęstości rzeczywistej i gęstości objętościowej (gęstość rzeczywistą oznaczono metodą piknometryczną, gęstość objętościową metodą pierścienia tnącego), porowatości efektywnej w trakcie oznaczania współczynnika filtracji [14], współczynnika filtracji w wodzie destylowanej przy zastosowaniu aparatu (permeometru) o zmiennym gradencie hydraulicznym [15, 16].

4. Charakterystyka żużli Zn-Pb

Żużle po przeróbce rud Zn-Pb z analizowanych obiektów na ogół charakteryzują się średnioziarnistą strukturą oraz czerwono-brązową lub szaro-brązową barwą (rys. 5a i 5b).



Rysunek 5. Żużle po przeróbce rud Zn-Pb: a) ze zwałowiska w Bykowie; b) ze zwałowiska w Wirku (fot. I. Jonczy)

W niektórych miejscach na powierzchni żużli widoczny jest biały nalot wtórnie krystalizujących faz wtórnych (rys. 6).

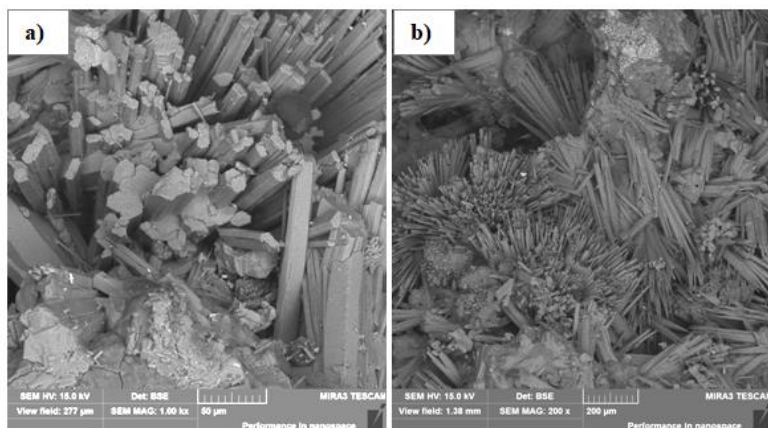


Rysunek 6. Żużel Zn-Pb ze zwałowiska w Wirku z białym nalotem krystalizujących minerałów wtórnych (fot. I. Jonczy)

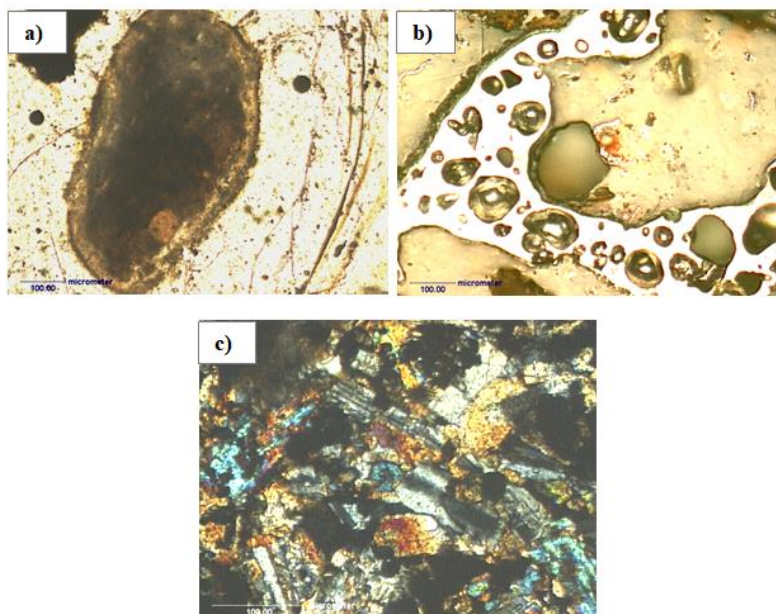
Tekstura żużli jest porowata, a odpady zalegające w odsłoniętych partiach zwałowisk, które są szczególnie narażone na oddziaływanie czynników atmosferycznych, łatwo się kruszą. Drobny materiał odpadowy jest podatny na wywiewanie. Badania przeprowadzone dla żużli ze zwałowiska w Wirku wykazały, że wartość porowatości całkowitej wynosi od 30,99 do 53,23%, natomiast porowatości efektywnej od 13,08% do 24,69% [12]. Według Sztelaka (1998) [17] porowatość przekraczająca 15% określana jest jako duża i bardzo duża. Dla odpadów oznaczono także współczynnik filtracji będący miarą przepuszczalności danego ośrodka. Na podstawie otrzymanych wartości, które mieściły się w przedziale od $1,05 \cdot 10^{-4}$ m/s do $3,75 \cdot 10^{-4}$ m/s, stwierdzono, że badane żużle to utwory przepuszczalne, charakteryzujące się średnią przepuszczalnością.

Badania wykazały, że w składzie żużli dominuje szkliwo, w obrębie którego występują krystality faz tlenkowych (magnetyt Fe_3O_4 , franklinit $\text{ZnFe}^{3+}_2\text{O}_4$, ferryty jedno- i dwuwapniowe $\text{CaO-FeO-Fe}_2\text{O}_3$) i krzemianowych (forsteryt Mg_2SiO_4 , augit $(\text{Ca,Na})(\text{Al,Fe,Mg,Ti})(\text{Al,Si})_2\text{O}_6$, anortyt $\text{Ca}[\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_8]$, pseudowollastonit $\text{Ca}_3\text{Si}_3\text{O}_9$, kirschsteinit $\text{CaFe}^{2+}\text{SiO}_4$, krzemiany dwuwapniowe $2\text{CaO} \cdot \text{SiO}_2$, willemit $\text{Zn}_2[\text{SiO}_4]$).

Zaobserwowano także sporadycznie pojawiające się wytrącenia metaliczne cynku i ołowiu w postaci drobnych kropli nieoddzielonych od żużla w trakcie procesu hutniczego. Oddzielną grupę składników stanowią minerały wtórnie krystalizujące w zwałowisku, można do nich zaliczyć minerały z grupy siarczanów: gips $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ oraz baryt BaSO_4 , węglany reprezentowane przez kalcyt CaCO_3 , a także utlenione związki żelaza, głównie hematyt Fe_2O_3 oraz sporadycznie getyt FeOOH . Przykładowe mikrofotografie żużli Zn-Pb wykonane przy wykorzystaniu różnych technik mikroskopowych przedstawiono na rysunku 7 i 8.



Rysunek 7. Gips krystalizujący na powierzchni żużli Zn-Pb ze zwałowiska w Bykowinie (SEM) [mikrofotografie wykonane w Centrum Materiałów Ogniotrwałych w Gliwicach]



Rysunek 8. Składniki żużli Zn-Pb ze zwałowiska w Wirku: a) szkliwo – światło przechodzące, polaryzatory równoległe, powiększenie 100x); b) wytrącenie metaliczne – światło odbite, polaryzatory równoległe, powiększenie 100x); c) pirokseny i plagioklasy – światło przechodzące, polaryzatory równoległe, powiększenie 100x) (fot. I. Jonczy)

Skład chemiczny żużli jest dość zróżnicowany, dominującym składnikiem jest krzemionka, której towarzyszą: Al, Mg, Ba, K, a także siarka i metale ciężkie. W tabeli 2 przedstawiono przykładowe analizy.

Tabela 2. Skład chemiczny żużli Zn-Pb, przykładowe analizy

Składnik	Zawartość [%] / Nr analizy					
	Żużle ze zławowiska w Bykowie			Żużle ze zławowiska w Wirku*		
	1	2	3	1	2	3
SiO ₂	24,55	52,62	36,73	21,72	21,60	19,29
Al	8,39	11,44	13,47	2,38	1,99	3,74
Ba	0,27	0,43	0,79	0,05	0,05	0,06
Ca	9,05	5,26	7,92	7,75	7,44	5,28
Fe	21,36	8,04	13,58	16,90	16,60	13,40
K	1,14	1,75	1,78	0,49	0,22	0,55
Mg	3,30	2,20	3,58	1,34	1,44	1,48
Mn	0,31	0,30	0,28	0,04	0,09	0,19
Na	0,32	0,26	0,28	0,08	0,08	0,12
P	0,04	0,06	0,14	0,036	0,041	0,095
Pb	0,32	0,08	0,14	0,77	0,74	0,84
S	0,86	0,02	0,29	6,49	6,22	5,41
Ti	0,36	0,45	0,55	0,17	0,15	0,33
Zn	2,29	3,21	1,09	4,15	8,37	5,11
Cd	0,00	0,00	0,00	0,008	0,007	0,011

Źródło: * opracowano wg [12].

Badania przeprowadzone dla żużli ze zławowiska w Bykowie i Wirku wykazały, że zawartość krzemionki zawiera się w granicach odpowiednio od 24,55% do 55,62% i od 19,29% do 21,72%. W obydwu analizowanych rodzajach żużli zaznacza się obecność Fe, którego zawartość dla żużli ze zławowiska w Bykowie wynosi od 8,04% do 21,36%, natomiast w żużlach ze zławowiska w Wirku osiąga wartości w granicach od 13,40% do 16,90%. Na podobnym poziomie w obydwu rodzajach żużli kształtuje się zawartość Ca (od 5,26% do 9,05% dla żużli ze zławowiska w Bykowie; od 5,28% do 7,75% dla żużli ze zławowiska w Wirku). W żużlach ze zławowiska w Bykowie w stosunku do żużli ze zławowiska w Wirku odnotowano wyższą zawartość: Al (od 8,39% do 13,47%), Ba (od 0,27% do 0,79%), K (od 1,14% do 1,78%) oraz Mg (od 2,20% do 3,58%). Z kolei w żużlach ze zławowiska w Wirku wzrasta zawartość metali ciężkich: Pb (od 0,74% do 0,84%), Zn (od 4,15% do 8,37%), ponadto tylko w tym rodzaju żużli stwierdzono obecność Cd (od 0,007% do 0,011%). W żużlach ze zławowiska w Wirku stwierdzono także dość wysoką zawartość S, przekraczającą 6%.

5. Procesy zachodzące w zławowiskach

Żużle Zn-Pb zgromadzone na zławowiskach w Wirku i Bykowie pod wpływem oddziaływania czynników zewnętrznych ulegają przeobrażeniom zarówno o charakterze fizycznym, jak i chemicznym. Na przestrzeni lat w zławowiskach miały miejsce następujące procesy:

- **wietrzenie fizyczne** żużli przejawiające się rozpadem ziarnowym materiału odpadowego – na niezabezpieczonych zławowiskach ich odsłonięte skarpy i powierzchnia

są źródłem pylenia, a także osypywania się zgromadzonego na zwałowisku materiału, co prowadzi do jego rozprzestrzeniania się na tereny otaczające. Drobny materiał odpadowy oraz pył przemieszczane drogą eoliczną stanowią źródło zanieczyszczenia powietrza oraz gleby;

- **dewitryfikacja szkliwa oraz wietrzenie faz krystalicznych** – procesy przeobrażeń składników odpadów zachodzą ze zmienną intensywnością, najszybciej przebiega proces dewitryfikacji szkliwa [12, 18]. Z faz krystalicznych jako pierwsze przeobrażeniom ulegają oliwiny, kolejno: pirokseny i plagioklasy;
- **utlenianie minerałów siarczkowych** – siarka zawarta w minerałach siarczkowych oraz w szkliwie w warunkach oddziaływania czynników zewnętrznych łatwo ulega utlenieniu, w wyniku czego powstają siarczany, których jony przenikają do roztworów infiltrujących odpady, przyczyniając się w ten sposób do zakwaszenia środowiska i stworzenia dogodnych warunków dla migracji metali ciężkich;
- **przemieszczanie się metali wraz z migrującymi roztworami** – żuźle hutnicze na ogół są materiałem charakteryzującym się znaczną porowatością, co ułatwia inżynierę roztworów omywających bryłę zwałowiska w jego głębsze partie. W zwałowiskach, zwłaszcza tych niezabezpieczonych i tym samym narażonych na oddziaływanie procesów wietrzenia, często powstają liczne szczeliny oraz pustki, które również są wykorzystywane przez migrujące roztwory. Podczas przemieszczania się przez warstwy materiału odpadowego roztwory wymywają zawarte w nich składniki. W przypadku odpadów Zn-Pb mogą to być metale ciężkie, czemu sprzyja kwaśny odczyn środowiska z uwagi na obecność w żużlach związków siarki [19];
- **krystalizacja faz wtórnych** – na powierzchni odpadów zalegających na zwałowiskach często można zaobserwować biały nalot, który jest związany z krystalizacją minerałów wtórnych, najczęściej są to minerały z grupy siarczanów: gips $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ oraz baryt BaSO_4 , a także – reprezentujący węglany – kalcyt CaCO_3 (rys. 9). Obok nich można zaobserwować znaczne nagromadzenie utlenionych związków żelaza, które są reprezentowane przez hematyt Fe_2O_3 (rys. 10).



Rysunek 9. Minerały wtórne (biały nalot) krystalizujące na powierzchni żużli ze zwałowiska w Bykowie (fot. A. Bartela)



Rysunek 10. Czerwony nalot hematytu na żużlach ze zwałowiska w Wirku (fot. I. Jonczy)

6. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań wyciągnięto następujące wnioski:

- w składzie żużli ze zwałowiska w Wirku oraz w Bykowie dominującym składnikiem jest szkliwo, obok którego w mniejszych ilościach występują wytrącenia metaliczne oraz fazy krystaliczne;
- fazy krystaliczne sporadycznie tworzą dobrze wykształcone kryształy, na ogół występują w postaci drobnych kryształitów otoczonych przez szkliwo;
- wśród składników fazowych wyróżniono fazy pierwotne związane z wsadem hutniczym oraz fazy wtórne krystalizujące na zwałowiskach. Wśród faz pierwotnych oznaczono: magnetyt, franklinit, ferryty jedno- i dwuwapniowe, forsteryt, augit, anortyt, pseudowollastonit, kirschsteinit, krzemiany dwuwapniowe oraz willemity. Do faz wtórnych zaliczono: gips, baryt, kalcyt, hematyt, getyt;
- w zwałowiskach zachodzą nieustanne procesy fizykochemiczne prowadzące do przeobrażeń żużli, a także zawartych w nich składników. Składniki odpadów są w różnym stopniu zachowane, zależnie od ich odporności na wietrzenie oraz od kontaktu z migrującymi roztworami. Najlepiej zachowanymi składnikami odpadów są wytrącenia metaliczne, tlenki metali, ferryty jedno- i dwuwapniowe oraz krzemiany dwuwapniowe. Przeobrażeniu uległy głównie oliwiny (forsteryt) i szkliwo, w mniejszym stopniu pirokseny (augit) oraz skalenie (anortyt);
- w składzie chemicznym żużli ze zwałowiska w Bykowie i Wirku dominuje krzemionka, zaznacza się także obecność Fe oraz Ca. Pozostałe składniki: Al, Ba, K, Mg występują w mniejszych ilościach. W żużlach obecne są także metale ciężkie – Pb i Zn, ponato w odpadach ze zwałowiska w Wirku stwierdzono obecność Cd, a także dość wysoką zawartość S;
- zwałowiska stanowią nieustanne zagrożenie dla środowiska. Racjonalnym działaniem mającym na celu zapobiec ich szkodliwemu wpływowi na środowisko wydaje się utworzenie na ich powierzchni powłoki ochronnej, która pozwoli na stworzenie dogodnych warunków dla wzrostu zwartej okrywy roślin zielnych. Koniecznym jest również przeprowadzenie izolacji wokół zwałowisk, co uniemożliwi infiltrację metali ciężkich do gleby.

Uwagi ogólne

Praca wykonana w ramach BK-302/RG2/22 (06/020/BK_22/0063).

Literatura

1. Górecka E., Bellok A., Socha J., Wnuk R., Kibitlewski S., *Zróżnicowanie zawartości metali w odpadach flotacyjnych rud Zn-Pb (ZGH Bolesław, rejon olkuski)*, Przegląd Geologiczny, 10, 1994, s. 834-841.
2. Lis J., Pasieczna A., *Anomalie geochemiczne Pb-Zn-Cd w glebach na Górnym Śląsku*, Przegląd Geologiczny, 2, 1997, s. 182-189.
3. Jarzębski L. (red.), *Raport o stanie środowiska w województwie katowickim w latach 1995-1996*, Państwowa Inspekcja Ochrony Środowiska, Katowice 1997.
4. Helios-Rybicka E., *Impact of mining and metallurgical industries on the environment in Poland*, Appl. Geoch., 11, 1996, s. 3-9.
5. Verner J.F., Ramsey M.H., Helios-Rybicka E., Jędrzejczyk B., *Heavy metal contamination of soils around a Pb-Zn smelter in Bukowno, Poland*, Appl. Geoch., 11, 1996, s. 11-16.
6. Chodyniecka L., Dudkiewicz J., *Ostrożnie z rekultywacją składowisk odpadów hutniczych*, Aura, 12, 1996, s. 8-10.
7. Cabała J., *Metale ciężkie w środowisku glebowym olkuskiego rejonu eksploatacji rud Zn-Pb*, Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego, Katowice 2009.
8. Dworak J.S., Karol Godula – pionier przemysłu cynkowego na Górnym Śląsku, Państwowy Instytut Naukowy, Instytut Śląski w Opolu, Związek Górnośląski, koło Nowy Bytom w Rudzie Śląskiej, Opole–Ruda Śląska 1995.
9. Dworak J.S., Ratka A., *Ruda Śląska – przewodnik*, Towarzystwo Przyjaciół Miasta Rudy Śląskiej, Oddział Miejski Polskiego Towarzystwa Turystyczno-Krajoznawczego w Rudzie Śląskiej, Ruda Śląska 1985.
10. Popiołek K., *Górnośląski przemysł górniczo-hutniczy w drugiej połowie XIX wieku*, Śląski Instytut Naukowy w Katowicach, Państwowe Wydaw. Naukowe. Oddział, Katowice–Kraków 1965.
11. Ratka A., *Ruda Śląska (1295-1995)*, Urząd Miejski w Rudzie Śląskiej, Towarzystwo Przyjaciół Rudy Śląskiej, 1995.
12. Jonczy I., *Charakterystyka mineralogiczno-chemiczna zwałowiska odpadów poprodukcyjnych huty cynku i ołowiu w Rudzie Śląskiej-Wirku oraz jego wpływ na środowisko*, Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice 2006.
13. <https://muzeumslaskie.pl/pl/ruda-slaska-huta-cynku-hugo/> [data dostępu: 29.10.2022].
14. Rygus P., *Zarys historyczny hutnictwa cynku na Górnym Śląsku w latach 1798-1980*, Fundacja Ochrony Dziedzictwa Przemysłowego Śląska, Katowice 2015.
15. Marciniak M., Przybyłek J., Herzig J., Szczepańska J., *Badania współczynnika filtracji utworów półprzepuszczalnych w kopalniach podziemnych*, Wydawnictwo SORUS, Poznań 1998.
16. Pazdro Z., Kozerski B., *Hydrogeologia ogólna*, Wydawnictwa Geologiczne, Warszawa 1990.
17. Sztelak J., *Hydrogeologia górnicza i sposoby zwalczania zagrożeń wodnych w kopalniach podziemnych*, Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice 1998.
18. Jonczy I., *Charakterystyka mineralogiczno-chemiczna szkliv z żużli hutniczych*, Gospodarka Surowcami Mineralnymi – Mineral Resources Management, 27(1), 2011, s. 155-163.
19. Jonczy I., *Możliwości migracji metali ciężkich ze zwałowisk żużli hutniczych*, [w:] Janiszewska M. (red.), *Ochrona środowiska – nowe rozwiązania i perspektywy na przyszłość*, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, Lublin 2022, s. 334.

Charakterystyka mineralogiczno-chemiczna żużli hutniczych po przeróbce rud Zn-Pb ze zwałowisk w Wirku i Bykowinie (Ruda Śląska)

Streszczenie

Historia górnictwa rud Zn-Pb na Górnym Śląsku sięga okresu wczesnego średniowiecza. Jednym z pierwszych i znaczących ośrodków, gdzie eksploatowano i przetapiano rudy cynku i ołowiu były tereny dzisiaj zajmowane przez miasto Ruda Śląska. Rozkwit przemysłu nastąpił na przełomie XVIII i XIX wieku, wtedy na tym terenie działały liczne cynkownie, a rozwojowi przemysłu sprzyjała obecność bogatych złóż surowców. Początkowo wykorzystywano występujące na niewielkich głębokościach utlenione rudy galmanowe, jednak wprowadzenie nowych technik eksploatacji pozwoliło sięgnąć po zalegające na większej głębokości rudy siarczkowe, bogate w sfaleryt (ZnS) oraz galenę (PbS) – często okruszczowaną srebrem. Cynkownie działały do lat 30. ubiegłego stulecia, natomiast do dziś na terenie Rudy Śląskiej pozostały 4 ponad 100-letnie zwałowiska odpadów pocynkowych. Na 2 z nich przeprowadzono prace rekultywacyjne związane z wykonaniem obudowy biologicznej oraz wkomponowaniem terenu zajmowanego przez zwałowiska w otaczający kraj- obraz. Pozostałe 2 nadal są niezabezpieczone, ich odsłonięte skarpy oraz powierzchnia są stale narażone na oddziaływanie czynników zewnętrznych, co jest przyczyną zachodzenia w zwałowiskach szeregu procesów, do których można zaliczyć: rozpad ziarnowy materiału odpadowego, dewitryfikację szkliwa oraz wietrzenie faz krystalicznych, migrację metali ciężkich wraz z roztworami infiltrującymi odpady, krystalizację faz wtórnych. Materiał zgromadzony na zwałowiskach, reprezentowany przede wszystkim przez żużle hutnicze, charakteryzuje się czerwono-brązową barwą, średnioziarnistą strukturą oraz porowatą teksturą. W składzie chemicznym żużli, pomimo ich długoletniego składowania, nadal obecne są metale ciężkie oraz siarka. Przykładowo, w żużlach ze zwałowiska w Bykowinie odnotowano obecność Zn, Pb, Ti oraz znaczną ilość Fe – dochodzącą do 20%. Żelazo związane jest z hematytom Fe_2O_3 , którego obecność świadczy o zwietrzeniu żużli, ale także wskazuje, że pierwotnie przetapianym surowcem były tzw. czerwone galmany – utlenione rudy Zn-Pb o charakterystycznym czerwonym zabarwieniu związanym z obecnością rozproszonego hematytu. Z kolei obecność w materiale odpadowym Zn w ilości przekraczającej kilka procent z jednej strony wskazuje, że obok galmanów eksploatowano również rudy siarczkowe, z drugiej – świadczy, że ówczesnie stosowane technologie pozyskiwania metali nie były zbyt precyzyjne.

Słowa kluczowe: zwałowisko odpadów, żużel hutniczy, metale ciężkie

Mineral and chemical characteristics of metallurgical slags after processing of Zn-Pb ores from dumps in Wirk and Bykowina (Ruda Śląska)

Abstract

The history of Zn-Pb ore mining in Upper Silesia dates back to the early Middle Ages. One of the first and significant centers where zinc and lead ores were exploited and smelted were the areas today occupied by the city of Ruda Śląska. Industry flourished at the turn of the 18th and 19th centuries, when numerous zinc smelters operated in this area, and the development of industry was favored by the presence of rich deposits of raw materials. Initially, oxidized calamine ores occurring at shallow depths were used, but the introduction of new mining techniques made it possible to reach for sulphide ores, rich in ZnS sphalerite and PbS galena – often with silver, that were deposited at greater depths. The zinc smelters operated until the 1930s, while to this day in Ruda Śląska there are four, over a hundred-year-old, post-zinc waste dumps. On two of them, reclamation works were carried out related to the implementation of biological support and the incorporation of the land occupied by the dump into the surrounding landscape. The other two are still unsecured, their slopes and the surface are constantly exposed to the influence of external factors, which is the reason why a number of processes take place in the dumps, which include: grain decomposition of waste material, devitrification of glass and weathering of crystalline phases, migration of heavy metals along with waste infiltrating solutions, crystallization of secondary phases. The material collected in dumps, represented mainly by metallurgical slags, is characterized by a red-brown colour, medium-grained structure and porous texture. In the chemical composition of slags, despite their long storage, heavy metals and sulphur are still present. For example, in the slags from the Bykowina dump, the presence of Zn, Pb, Ti and a significant amount of Fe, up to 20%, was recorded. Iron is associated with hematite Fe_2O_3 , the presence of which indicates the weathering of slags, but also indicates that the raw material originally melted down was the so-called red calamine – oxidized Zn-Pb ores with a characteristic red color associated with the presence of dispersed hematite. On the other hand, the presence of Zn in the waste material in an amount exceeding several %, on the one hand, indicates that apart from calamines, sulphide ores were also exploited, and on the other hand, it proves that the technologies for obtaining metals used at that time were not very precise.

Keywords: waste dump, metallurgical slag, heavy metals

Wyodrębnianie i stabilizacja jednorodnego obszaru w układach ciekłokrystalicznych za pomocą kontrolowanego fotowysbielenia laserowego

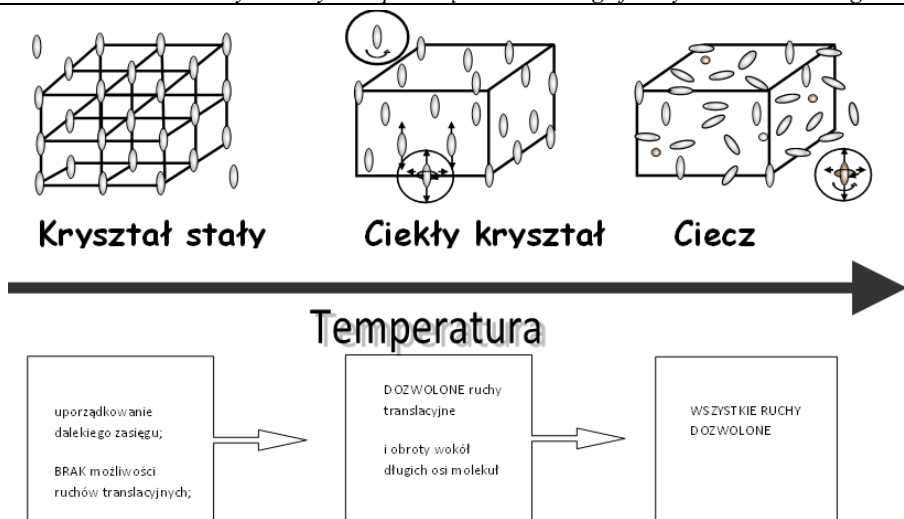
1. Wstęp

Dziedzina badań naukowych nad ciekłymi kryształami i ich zastosowaniami zmieniła się ostatnio w sposób zasadniczy [1]. Do tej pory skoncentrowane były na zastosowaniach w wyświetlaczach ciekłokrystalicznych i elementach migawek optycznych. Obecnie spektrum możliwości obejmuje całkiem nowe i różnorodne zastosowania w obszarze nanotechnologii i nanonauki. Stabilizacja mezofazy, poszerzenie i kontrolowanie jej zakresu temperaturowego poprzez zastosowanie polimerów i biopolimerów [2], szczególnie istotne w przypadku faz cechujących się bardzo wąskim (od 0,1°C do 2°C) zakresem występowania, na przykład w tzw. egzotycznych fazach ciekłokrystalicznych: fazach błękitnych (BP) charakteryzujących się dyspersją stałej Kerra [3] czy w chiralnych fazach smektycznych (SmC^*_α , SmC^*_β , SmC^*_γ) [4]. Coraz częściej stosuje się funkcjonalne nano-cząstki do modyfikacji właściwości fizycznych ciekłych kryształów poprzez dodanie cząstek ferroelektrycznych [5], antyferroelektrycznych [6] czy magnetycznych o najróżniejszych wielkościach i kształtach. Coraz większą popularnością cieszą się również cząstki wpływające na właściwości optyczne, np. kropki kwantowe plazmoneczne, półprzewodnikowe czy metamateriały. Samoorganizacja ciekłych kryształów jest wykorzystywana do porządkowania i orientowania matryc, co obecnie znajduje zastosowanie między innymi w inteligentnych szybach czy elastomerach ciekłokrystalicznych [7].

Czym są ciekłe kryształy? Ciekłe kryształy stanowią grupę materiałów, które charakteryzują się własnościami reologicznymi zbliżonymi do cieczy (brak sztywnej sieci krystalicznej umożliwia płynięcie). Jednocześnie wykazują anizotropię własności fizycznych, co oznacza, że wielkości fizyczne mierzone w różnych kierunkach mają różne wartości [8, 9]. Jest to cecha charakteryzująca kryształy i niewystępująca w cieczach [10]. W fazie krystalicznej wszystkie cząsteczki są ściśle uporządkowane i nie mogą poruszać się swobodnie. W fazie ciekłej natomiast – cząsteczki mają pełną swobodę przemieszczania się i jednocześnie nie są w żaden sposób dalekozasięgowo uporządkowane. Jak można się domyślić, w fazie ciekłokrystalicznej sytuacja jest pośrednia – cząsteczki mają częściową swobodę ruchu i jednocześnie są częściowo uporządkowane (rys. 1).

¹ dardas@ifmpan.poznan.pl, Instytut Fizyki Molekularnej Polskiej Akademii Nauk, ul. Smoluchowskiego 17, 60-179 Poznań, <https://orcid.org/0000-0001-8552-7845>.

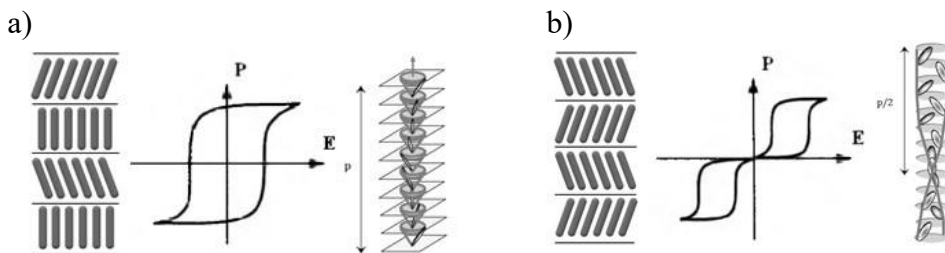
² Wydział Inżynierii Materiałowej i Fizyki Technicznej, Politechnika Poznańska, Piotrowo 3, 60-965 Poznań, <https://orcid.org/0000-0003-4971-4189>.



Rysunek 1. Uproszczony schemat przemian fazowych:
krystaliczne ciało stałe – ciekły kryształ – ciecz izotropowa [9]

Dla wielu materiałów przejście między fazą ciekłą a stałą nie jest procesem jednoetapowym, ale szeregiem różnych mezofaz. Podsumowując, ciekłe kryształy są samoorganizującymi się anizotropowymi płynami, które termodynamicznie znajdują się pomiędzy izotropową cieczą a fazą krystaliczną, wykazując płynność cieczy, jak również długodystansowy porządek sieciowy, który można znaleźć tylko w krystalicznych ciałach stałych [11-13]. Generalnie ciekłe kryształy składają się z anizotropowych bloków budulcowych, które są spontanicznie zorientowane wzdłuż określonego kierunku, zwanego dyrektorem n [14]. Bez zewnętrznej siły porządkującej dyrektor nematycznego ciekłego kryształu (najprostszej z faz ciekłokrystalicznych), którego molekuly są uporządkowane tylko orientacyjnie, jest zwykle przestrzennie zmieniany w sposób ciągły, ale losowo na dużych przestrzeniach (z wyjątkiem defektów, gdzie dyrektor może zmieniać się nagle i drastycznie) [15-16]. Zazwyczaj ciekłe kryształy można podzielić na dwie typowe kategorie, tj. termotropowe ciekłe kryształy i liotropowe ciekłe kryształy [17-20]. Termotropowe ciekłe kryształy są zwykle dalej rozróżniane na podstawie kształtu ich cząsteczek składowych: kalamityczne – dla cząsteczek przypominających pręty, dyskotyczne – dla cząsteczek przypominających dyski i sanidyczne – dla cząsteczek przypominających cegły. Typowy mezogen kalamityczny składa się na ogół ze sztywnego rdzenia, często zawierającego grupy fenylowe i bifenylowe, oraz dwóch elastycznych grup końcowych, często łańcuchów alkilowych lub alkoksylowych. Wspólną strukturą mezogenów dyskotycznych jest sztywny, dyskopodobny rdzeń, do którego przyłączonych jest sześć elastycznych grup końcowych. Poza tymi konwencjonalnymi mezogenami ostatnio uwagę badaczy skupiają tzw. niekonwencjonalne ciekłe kryształy [21], które nie mają ani kształtu pręta, ani dysku, często zwane molekułami bananopodobnymi. I teraz, wraz ze wzrostem temperatury, typowy termotropowy LC przechodzi przez fazy wyżej uporządkowane, zwane również miękkimi kryształami, heksatyczne fazy smektyczne z porządkiem pozycyjnym, jak również porządkiem orientacyjnym wiązań, przez płynne

fazy smektyczne takie jak faza smektyczna C i faza smektyczna A, które wykazują zarówno uporządkowanie pozycyjne, jak i orientacyjne, wreszcie – do fazy nematycznej (N) z uporządkowaniem wyłącznie orientacyjnym, następnie do fazy ciekłej, izotropowej. Liczba obserwowanych różnych faz zależy od składu chemicznego, symetrii i uporządkowania cząsteczek LC. Dotychczas znanych jest około 25 różnych faz termotropowych, a ich liczba wciąż rośnie [22]. Dodatkowym elementem modyfikującym strukturę jest dodanie cząsteczki chiralnej do badanego układu, przez co ciekły kryształ staje się chiralny [23, 24]. Symetria chiralna, inaczej „chiralność” (z gr. *cheir* – ręka) to topologiczna własność par figur geometrycznych polegająca na tym, że figury te nie dają się nałożyć tylko przez przesunięcia i obroty, lecz można przekształcić jedną w drugą poprzez odbicie względem płaszczyzny lub osi inwersyjnej. Takie pary obiektów nazywa się enancjomorfami. Mówiąc prościej, chiralny jest każdy obiekt, którego lustrzane odbicie nie jest takie jak on sam. Ze względu na dalekozasięgowe uporządkowanie molekuł ciekłych kryształów chiralność molekularna ma znaczący wpływ na makroskopowe, fizyczne zjawiska w nich zachodzące [25]. Podstawowe optyczne zastosowania ciekłych kryształów związane są ze strukturą chiralną, na przykład termochromatyczny efekt w cholesterycznych ciekłych kryształach czy ferroelektryczne i antyferroelektryczne przełączanie w smektycznych ciekłych kryształach. Warto tutaj zauważyć, że w ciekłych kryształach mamy do czynienia z dwoma rodzajami „chiralności”: chiralność molekuł – mogą one posiadać jedno lub więcej centrów chiralnych (molekuły chiralne, które nie posiadają żadnego elementu symetrii istnieją w dwóch formach enancjomerycznych) oraz chiralność faz – związana z obecnością struktury śrubowej w danej fazie. Niektóre fazy mogą nie być chiralne, mimo że molekuły są asymetryczne. Fazy o własnościach chiralnych oznaczamy gwiazdką (*). Przyjrzyjmy się teraz bliżej własnościom fazy smektycznej C*. W 1974 roku Robert Meyer i współpracownicy [26] na podstawie rozważań teoretycznych i doświadczeń stwierdzili, że skośna faza SmC* utworzona z chiralnych molekuł wykazuje własności ferroelektryczne. Poprzez dodanie grupy chiralnej do molekuły została wyeliminowana płaszczyzna zwierciadlana i – co się z tym wiąże – środek inwersji. Molekuły ciekłego kryształu utworzyły wtedy fazę smektyczną C*. Chiralność powoduje uporządkowanie momentów dipolowych związanych z grupą chiralną w każdej warstwie smektyka C oraz pojawienie się momentu dipolowego równoległego do płaszczyzny warstwy, prostopadłego do płaszczyzny ich pochylenia. Uporządkowanie momentu dipolowego jest równoznaczne z pojawieniem się polaryzacji spontanicznej warstwy smektyka. Molekuły tworzą strukturę warstwową, przy czym rozkład ich środków mas w obrębie warstw jest przypadkowy. Molekuły w warstwie są pochylone o pewien kąt względem normalnej do warstwy, który to kąt zależy od temperatury oraz od rodzaju ciekłego kryształu. Dodatkowo kierunek pochylenia molekuł w kolejnych warstwach ulega skręceniu, tworząc strukturę śrubową. Struktura taka wykazuje istnienie lokalnej spontanicznej polaryzacji. Wypadkowa polaryzacja próbki o grubości równej skokowi śruby lub jej wielokrotności jest równa zero. Gdy w kolejnych warstwach molekuły chiralne są pochylone w przeciwnych kierunkach, a wypadkowe momenty dipolowe, które są prostopadłe do długich osi molekuł, znoszą się wzajemnie w sąsiednich warstwach smektycznych – obserwujemy własności antyferroelektryczne ciekłego kryształu z podwójną strukturą śrubową i efektem trójstopniowego przełączania (rys. 2).



Rysunek 2. Ułożenie molekuł w: a) ferroelektryku, pętla histerezy oraz zaznaczony skok śruby, b) antyferroelektryku, podwójna pętla histerezy oraz zaznaczony skok śruby [27-28]

Reasumując, liczba obserwowanych faz zależy od składu chemicznego, symetrii i uporządkowania cząsteczek ciekłego kryształu. Każda z subfaz charakteryzuje się unikalnymi własnościami anizotropowymi, optycznymi, elektrycznymi, lepkością sprężystymi, magnetycznymi, blisko- i dalekozasięgowymi oddziaływaniami oraz jednocześnie obrazami tekstur obserwowanymi przy użyciu optycznego mikroskopu polaryzacyjno-interferencyjnego. Co ciekawe, austriacki botanik Friedrich Richard Reinitzer odkrył ciekłe kryształy w 1888 roku. Pierwsze zastosowania pojawiły się dopiero w 1970 roku – prawie przez 100 lat naukowcy badali ciekłe kryształy wyłącznie pod kątem poznawczym, zafascynowani ich nietrywialnymi własnościami. Fakt, że kierunek direktora ciekłego kryształu, który często jest równoważny osi optycznej materiału, jest łatwo modyfikowany pod wpływem różnych bodźców zewnętrznych, takich jak pole mechaniczne, magnetyczne, elektryczne, optyczne, a także temperatura, uczynił ciekłe kryształy atrakcyjnymi zarówno dla przemysłu, jak i nauki, czego przykładem może być wart ponad 100 miliardów dolarów przemysł zbudowany wokół wyświetlaczy i wielkoekranowej, płaskiej elektroniki użytkowej. Ze względu na wielkie osiągnięcia w dziedzinie wyświetlaczy od lat 70. – LC są nadal jednymi z najbardziej popularnych materiałów na całym świecie [29].

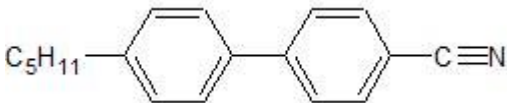
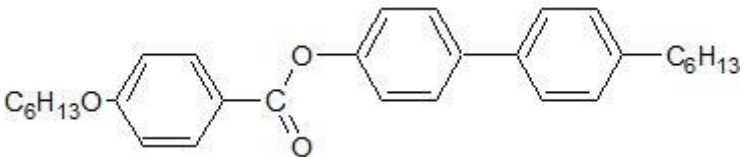
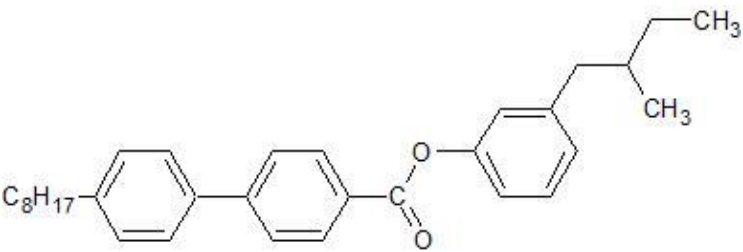
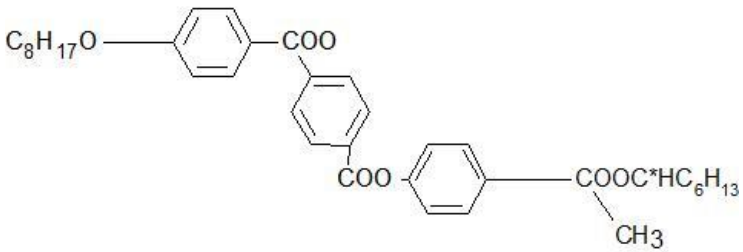
Znajomość właściwości materiałowych ciekłych kryształów i ich wpływu na strukturę, uporządkowanie, charakterystykę danej mezofazy i faz sąsiednich jest niezbędna do projektowania wysokosprawnych elementów optoelektronicznych, takich jak wyświetlacze ciekłokrystaliczne, modulatory światła czy filtry. Stosunkowo często wyznacza się stałe sprężystości i lepkości w silnych polach (co niejednokrotnie wywołuje przekroczenie zakresu proporcjonalności stałej sprężystości i generuje przepływ turbulentny, a powinien pozostać laminarny), rzadko stosuje się słabe pola elektryczne, choć są istotne w ocenie przydatności aplikacyjnej materiału [30-33]. Rodzaj i charakter przemian fazowych zachodzących w badanym materiale może mieć decydujący wpływ nie tylko na wartość wyznaczonych współczynników, ale także na ich zależność temperaturową. Dotychczas badane ciekłe kryształy nie pozwalają na wyciągnięcie wniosków dotyczących pełnej etiologii tych zjawisk. Aby uzyskać wyniki jednoznacznie charakteryzujące daną fazę, potrzebny jest materiał jednorodnie zorientowany w całej objętości próbki. Wysunięta została hipoteza, że metoda fotowyswieblania laserowego [34] może być dodatkowym sposobem stabilizacji warstw ciekłych kryształów. Metody, które będą wykorzystywane do badań w niniejszej pracy, to: skaningowa kalorymetria różnicowa DSC (ang. *differential scanning calorimetry*), mikroskopia polaryzacyjna POM (ang. *polarized optical microscopy*) służąca do obserwacji tekstur i rejestracji obrazów badanych próbek, fluorescencyjna mikroskopia konfokalna FCPM (ang. *fluorescence confocal polarizing micro-*

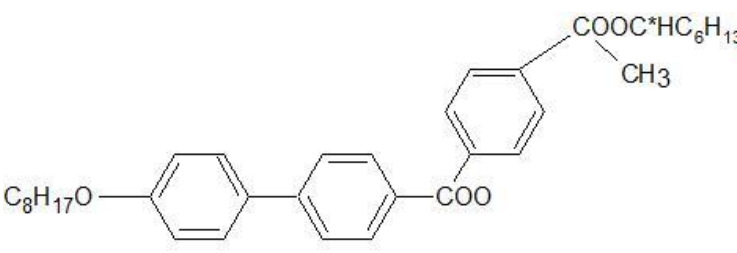
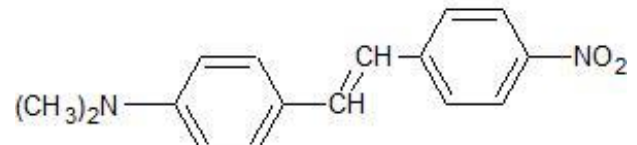
scopy) do trójwymiarowego obrazowania struktury badanej próbki, a także metoda dwuwymiarowej analizy tekstur [35]. Celem pracy było przetestowanie metody uzyskania dodatkowego efektu granicznego przy użyciu kontrolowanego fotowysielania laserowego za pomocą fluorescencyjnego konfokalnego mikroskopu polaryzacyjnego (FCPM) w homogenicznych komórkach ciekłych kryształów.

2. Część eksperymentalna

Metoda obserwacji tekstur przy użyciu mikroskopu polaryzacyjno-interferencyjnego (POM) została wykorzystana do określenia temperatury przejść fazowych bez pola i w polu elektrycznym. Do obserwacji wykorzystano mikroskop firmy Olympus BX53. W niniejszej pracy do badań użyto następujących ciekłych kryształów: 5CB, Ce3, Ce8, MHPOBC oraz MHPOPb. W tabeli 1 zestawiono wzory strukturalne badanych materiałów.

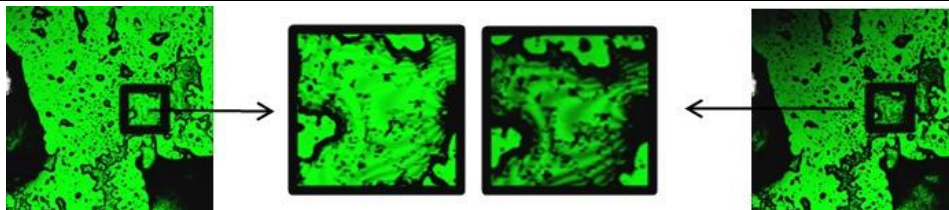
Tabela 1. Wzory strukturalne badanych materiałów

	Wzór strukturalny	Nazwa
1.		5CB
2.		Ce3
3.		Ce8
4.		MHPOPb

5.		MHPOBC
6.		DANS

Źródło: opracowanie własne na podstawie [28].

Ciekle kryształy są mieszane z barwnikiem fluorescencyjnym, by poprawić ich widoczność. Barwnik oraz jego stężenie były wybierane na podstawie efektu gościa-gospodarza. Do badań wybrano barwnik DANS, ponieważ jego molekuly posiadają kształt przybliżony do molekul badanych materiałów ciekłokrystalicznych, dobrze się z nimi miesza, a ilość barwnika nie wpływała na zmianę ich struktury. Po zmieszaniu otrzymano: CE8 + 0,1% DANS, 5CB + 0,1% DANS, CE3 + 0,1% DANS, MHPOBC + 0,1% DANS oraz MHPOPb + 0,1% DANS. Dodatkowo zastosowana została metoda kalorymetrii różnicowej DSC w celu porównania temperatur przemian fazowych w badanych mieszaninach ciekłokrystalicznych uzyskanych z obserwacji mikroskopowych. Pomiar wykonano przy użyciu kalorymetru Maya 2000 firmy Netzsch. Ostateczne pomiary i fotowypalanie laserowe wykonano przy użyciu konfokalnego mikroskopu fluorescencyjnego Fluoview FV1200 IX83. Zasada działania mikroskopu polega na tym, iż obie wiązki (wzbudzająca i detekcji) ogniskują się w jednym punkcie na określonej głębokości na badanej próbce. Jako źródło światła wykorzystuje się w tym przypadku lasery diodowe, które generują długości fal: 405 nm, 473 nm, 559 nm oraz 635 nm. Przy użyciu tej metody można zarejestrować serię przekrojów optycznych na dowolnych głębokościach preparatu, a także stworzyć trójwymiarowy obraz badanej próbki. Ponadto mikroskop może posłużyć do obserwacji jednorodności struktury oraz do znalezienia jej periodyczności. Jednak najważniejszymi cechami mikroskopu konfokalnego z punktu widzenia badań ciekłych kryształów jest to, że światło wzbudzające jest liniowo spolaryzowane oraz że molekuly barwnika fluorescencyjnego orientują się wzdłuż molekul gospodarza [36-37], odwzorowując uporządkowanie cieplego kryształu. Podczas procedury fotowypalania cząsteczki o właściwościach fluorescencyjnych ulegają przemianom chemicznym pod wpływem absorpcji światła. Następuje wtedy proces nieodwracalnego zaniku ich zdolności do fluorescencji, a przy odpowiednio silnej mocy wiązki laserowej – nawet do fotochemicznej destrukcji. Działania takie mogą wytwarzać granicę (rys. 3), która dodatkowo stabilizuje układ i kotwiczy molekuly cieplego kryształu w ściśle określonym obszarze.



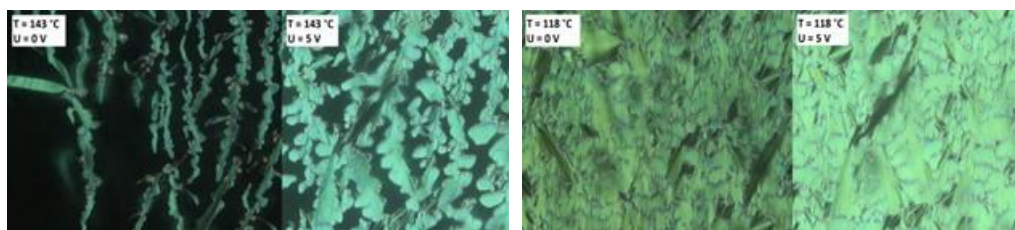
Rysunek 3. Proces fotowysielania laserowego [opracowanie własne]

3. Wyniki i ich dyskusja

W celu identyfikacji faz i temperatur przemian fazowych wykonano obserwacje mikroskopowe przy użyciu mikroskopu polaryzacyjno-interferencyjnego z jednoczesną rejestracją tekstur. Pomiary wykonano pomiędzy skrzyżowanymi polaryzatorami bez przyłożonego pola elektrycznego i w polu elektrycznym. Przykładowe obrazy dla materiału MHPOBC przedstawiono na rysunku 4.

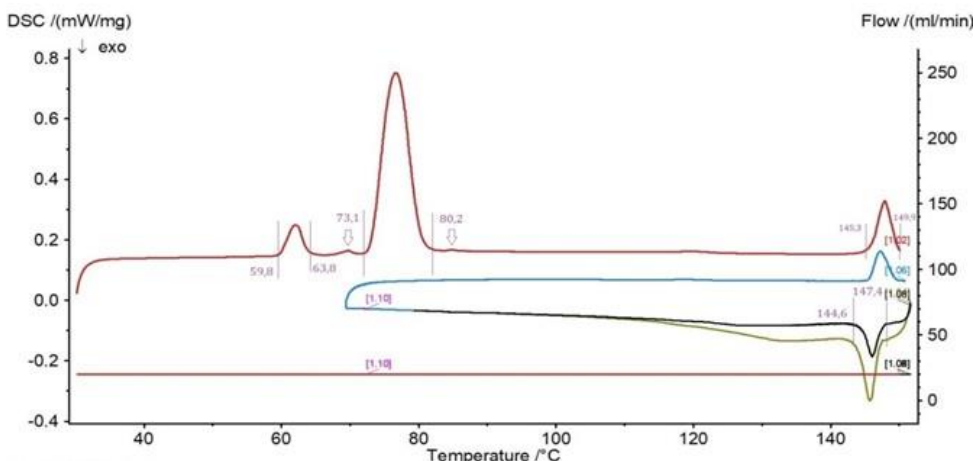
a)

b)



Rysunek 4. Porównanie zdjęć przy zerowym napięciu (po lewej) oraz przy napięciu równym 5V (po prawej) dla materiału MHPOBC w temperaturach: a) 143°C (faza antyferroelektryczna), b) 118°C (faza paraelektryczna) [28]

W celu weryfikacji zaobserwowanych przemian fazowych wykonano dla wszystkich badanych materiałów pomiary kalorymetryczne. Przykładowa zależność przedstawiona jest na rysunku 5.



Rysunek 5. Wykresy otrzymane z pomiaru DSC dla MHPOBC [28]

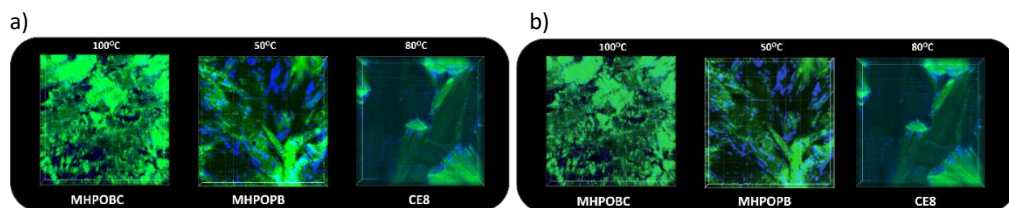
Na podstawie uzyskanych wyników określono temperatury przemian fazowych dla badanych materiałów, które zebrano w tabeli 2. Dodanie barwnika DANS nie wpłynęło na temperatury przejść fazowych.

Tabela 2. Temperatury przejść fazowych dla czystych materiałów

Materiał ciekłokrystaliczny	Temperatury przejścia [°C]
5CB	Kr 31,5→34,2 N → Iso
Ce8	Kr 48,0 →SmG* 63,3 → SmJ* 64,7 → SmF* 66,7 → SmI* 69,0 → SmC* 85,0 → SmA* 135,4 → Ch 140,7 → Iso
Ce3	Kr 66,0 → SmC* 78,8 → Ch 163,5 → Iso
MHPOBC	Kr 59,0 → SmC* _A 119,5 →SmC* _γ 120,5 → SmC* _β 121,9 → SmC* _α 123,0 → SmA* 150,2 → Iso
MHPOPb	Cr 57,8 → SmC* _A 60,5 → SmC* _γ 89,8 → SmC* _α 94,5 → SmA* 141,2 → Iso

Źródło: opracowanie własne na podstawie [28].

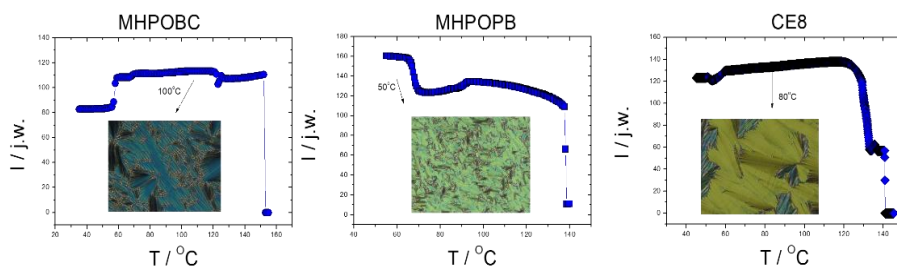
W tabeli 2 można zobaczyć dokładne temperatury przejść i fazy, jakie występują dla wszystkich badanych próbek. Widać, że materiały Ce8 i MHPOBC posiadają bogatą liczbę mezofaz. Natomiast 5CB oprócz fazy krystalicznej i izotropowej posiada tylko fazę nematyczną. Ponadto w materiałach Ce3, Ce8, MHPOBC oraz MHPOPb znajdują się molekuły chiralne. Na podstawie dwuwymiarowej analizy tekstur metodą cyfrową (szczegółowo opisaną w pracy [35]) uzyskano zależności intensywności światła przechodzącego przez próbkę umieszczoną pomiędzy skrzyżowanymi polaryzatorami. Wykresy zależności intensywności światła od temperatury w prosty sposób pokazują momenty przejść fazowych w badanych materiałach. Z przedstawionych na rysunku 6a) wykresów dla MHPOBC i MHPOPb wynika, że przejściu z fazy izotropowej do fazy smektycznej A towarzyszy gwałtowny skok intensywności światła. W próbce Ce8 pomiędzy fazą izotropową a SmA znajduje się jeszcze faza cholesteryczna. W tym przypadku przejście z fazy izotropowej do cholesterycznej odznacza się niewielką różnicą intensywności. Natomiast wzrost zauważalny jest dopiero przy przejściu z fazy cholesterycznej do smektycznej A. Przy użyciu konfokalnego mikroskopu fluorescencyjnego zarejestrowane zostały trójwymiarowe obrazy, zarówno przed procedurą fotowysbielenia laserowego, jak i po wykonanej procedurze. Fotowysbielenie laserowe wykonane zostało przy maksymalnej mocy laserów. Wyniki przedstawiono na rysunku 6.



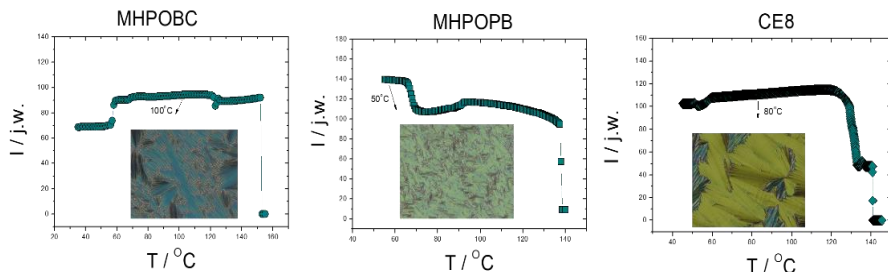
Rysunek 6. Trójwymiarowe obrazy uzyskane przy użyciu fluorescencyjnej mikroskopii konfokalno-polarizacyjnej dla materiałów MHPOBC, MHPOPB oraz Ce8, odpowiednio: a) przed fotowypalaniem i b) po fotowypalaniu [opracowanie własne]

Następnie ponownie wykonano analizę intensywności światła przechodzącego przez próbkę. Zarejestrowane zostały obrazy w funkcji temperatury uzyskane po procesie fotowysielania laserowego. Wyniki przedstawiono na rysunku 7b).

a) przed fotowypalaniem



b) po fotowypalaniu



Rysunek 7. Intensywność światła przechodzącego przez materiały ciekłokrystaliczne: MHPOBC, MHPOPB oraz Ce8 uzyskane metodą numerycznej analizy dwuwymiarowych tekstur, odpowiednio: a) przed fotowypalaniem i b) po fotowypalaniu [opracowanie własne]

Analiza otrzymanych wyników pokazuje, że fotowysielanie laserowe zmniejsza intensywność światła przechodzącego przez badany materiał ciekłokrystaliczny. Zaobserwowano jednak „zamrożenie” i stabilizację uporządkowania układu. Ponowne grzanie oraz chłodzenie materiału nie wpłynęło na zmianę obserwowanych tekstur. Nie udało się wyodrębnić w tym procesie obszaru o stałym kotwiczeniu, jednakże procedura fotowysielania laserowego wywołała „pamięć” uporządkowania materiału. Wyniki wymagają dalszej weryfikacji i sprawdzenia efektów starzenia w badanych materiałach oraz pomiarów długoterminowych.

4. Podsumowanie

W ramach pracy wytworzone zostały mieszaniny ciekłych kryształów z barwnikiem fluorescencyjnym o stężeniu 0,01%. Dobór rodzaju barwnika i jego stężenia zdeterminowany był zasadą gościa-gospodarza (molekuły barwnika miały przybliżony kształt do molekuł badanego ciekłego kryształu, a ilość barwnika nie wpływała na zmianę ich struktury). Do badań wykorzystano szereg ciekłych kryształów o właściwościach ferroelektrycznych (FLC) oraz antyferroelektrycznych (AFLC). Celem pracy było zweryfikowanie efektywności zaproponowanej metody i jej wpływu na podstawowe właściwości układu ciekłokrystalicznego w metastabilnych fazach (FLC, AFLC, BP). Wykonane badania pozwoliły jasno stwierdzić, że metoda fotowysielania laserowego (zwana też fotowypalaniem) wpływa na intensywność światła przechodzącego przez próbkę, ale nie zmienia jej struktury ani uporządkowania. Fotowypalanie laserowe przy użyciu mikroskopu konfokalnego wykonano tutaj dla maksymalnej mocy dostępnych laserów. Nie zauważono efektu fotochemicznej destrukcji (rys. 7). Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że stabilizację tekstury zapewnia „zamrożenie” molekuł w całej objętości próbki. Wyniki tej pracy poszerzają stan wiedzy na temat zastosowań fluorescencyjnej mikroskopii konfokalno-polarizacyjnej i właściwości optycznych badanych materiałów. Stabilizacja układu i kontrolowanie poziomu skali szarości próbki uzyskanych przy użyciu fotowysielania laserowego może zaowocować nowymi rozwiązaniami w dziedzinie optoelektroniki, adresowania i odczytywania danych.

Podziękowania

Praca została wykonana przy wsparciu finansowym Narodowego Centrum Nauki (NCN) w ramach grantu 2019/03/X/ST3/01516.

Serdecznie dziękujemy dr. inż. Sławomirowi Pieprzykowi z Instytutu Fizyki Molekularnej Polskiej Akademii Nauk za udostępnienie autorskiego programu do numerycznej analizy tekstur.

Literatura

1. Shen Y., Dierking I., *Perspectives in liquid-crystal-aided nanotechnology and nanoscience*, Appl. Sci., 9, 2019, s. 2512.
2. Hamley I.W., *Liquid crystal phase formation by biopolymers*, Soft Matter, 9, 2010, s. 1863-1871.
3. Yevchenko T., Dardas D., Kuczyński W., Brańka A.C., *Determining the Kerr constant in optically isotropic liquid crystals*, Physical Review E, 206, 2022, s. 14701.
4. Knapkiewicz M., Rachocki A., Bielejewski M., Sebastião P.J., *NMR studies of molecular ordering and molecular dynamics in a chiral liquid crystal with the SmCa* phase*, Physical Review E, 101, 2020, s. 52708.
5. Lalik S., Stefańczyk O., Dardas D., Górska N., Ohkoshi Sh.-I., Marzec M., *Modifications of FLC physical properties through doping with Fe₂O₃ nanoparticles (Part I)*, Materials, 14(16), 2021, s. 4722.
6. Lalik S., Stefańczyk O., Dardas D., Deptuch A., Yevchenko T., Ohkoshi Sh.-I., Marzec M., *Nanocomposites based on antiferroelectric liquid crystal (S)-MHPOBC doping with Au nanoparticles*, Molecules, 27(12), 2022, s. 3663.
7. Rešetič A., Milavec J., Domenici V., Zupančič B., Bubnov A., Zalar B., *Deuteron NMR investigation on orientational order parameter in polymer dispersed liquid crystal elastomers*, Phys. Chem. Chem. Phys., 22, 2020, s. 23064-23072.

8. Adamczyk A., *Niezwykły stan materii – ciekłe kryształy*, Wiedza Powszechna, Warszawa 1981.
9. Żmija J., Zieliński J., Parka J., Nowinowski-Kruszelnicki E., *Displeje ciekłokrystaliczne*, Wydawnictwa Naukowe PWN, Warszawa 1993.
10. Ratajczyk F., *Dwójłomność i polaryzacja optyczna*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2000.
11. Tschierske C., *Liquid crystals. Materials design and self-assembly*, Springer Science & Business Media, Berlin (Germany) 2012, s. 318.
12. Bisoyi H.K., Kumar S., *Liquid-crystal nanoscience. An emerging avenue of soft self-assembly*, Chem. Soc. Rev., 40, 2011, s. 306-319.
13. Kato T., Mizoshita N., Kishimoto K., *Functional liquid-crystalline assemble. Self-organized soft materials*, Angew. Chem. Int. Ed., 45, 2005, s. 38-68.
14. Ohzono T., Fukuda J.I., *Zigzag line defects and manipulation of colloids in a nematic liquid crystal in microwrinkle grooves*, Nat. Commun., 3, 2012, s. 701.
15. Chuang I., Durrer R., Turok N., Yurke, B., *Cosmology in the laboratory. Defect dynamics in liquid crystals*, Science, 251, 1991, s. 1336-1342.
16. Pieranski P., Yang B., Burtz L.-J., Camu A., Simonetti F., *Generation of umbilics by magnets and flows*, Liq. Cryst., 40, 2013, s. 1593-1608.
17. Dierking I., Al-Zangana S., *Lyotropic liquid crystal phases from anisotropic nanomaterials*, Nanomaterials, 7, 2017, s. 305.
18. Saliba S., Mingotaud C., Kahn M.L., Marty J.-D., *Liquid crystalline thermotropic and lyotropic nanohybrids*, Nanoscale, 5, 2013, s. 6641-6661.
19. Laschat S., Baro A., Steinke N., Giesselmann F., Hägele C., Scalia G., Judele R., Kapatsina E., Sauer S., Schreivogel A., Tosoni M., *Discotic liquid crystals. From tailor-made synthesis to plastic electronics*, Angew. Chem. Int. Ed., 46, 2007, s. 4832-4887.
20. Hegmann T., Qi H., Marx V.M., *Nanoparticles in liquid crystals. Synthesis, self-assembly, defect formation and potential applications*, J. Inorg. Organomet. Polym. Mater., 17, 2007, s. 483-508.
21. Takezoe H., Eremin A., *Bent-Shaped Liquid Crystals. Structures and Physical Properties*, CRC Press, Boca Raton (FL, USA) 2017.
22. Dierking I., *Textures of liquid crystals*, John Wiley & Sons, Hoboken (NJ, USA) 2003.
23. Lagerwall S.T., *Chirality, symmetry and physical effects*, [w:] Kuczyński W. (red.), *Chiral liquid crystals*, s. 185-222, Instytut Fizyki Molekularnej PAN, Poznań 2005.
24. Dardas D., Kuczyński W., *Non-linear electrooptical effects in chiral liquid crystals*, Optoelectronics Review, 2(3), 2004, s. 277-280.
25. Kuczyński W., Goc F., Dardas D., Dąbrowski R., Hoffmann J., Stryła B., Małecki J., *Phase transitions in a liquid crystal with long-range dipole order*, Ferroelectrics, 274, 2002, s. 83-100.
26. Meyer R.B., Liebert L., Strzelecki L., Keller P., *Ferroelectric liquid crystals*, J. Phys. Lett., 36(3), 1975, s. 69-71.
27. Dardas D., *Liniowy i kwadratowy efekt elektrooptyczny w chiralnych smektykach*, rozprawa doktorska, Instytut Fizyki Molekularnej PAN, Poznań 2006.
28. Nowacka Z., *Badanie wybranych własności optycznych i elektrooptycznych w układach ciekłokrystalicznych domieszkowanych barwnikiem fluorescencyjnym*, praca dyplomowa inżynierska, Wydział Inżynierii Materiałowej i Fizyki Technicznej, Politechnika Poznańska, Poznań 2022.
29. Lagerwall J.P.F., Scalia G., *A new era for liquid crystal research. Applications of liquid crystals in soft matter nano-, bio- and microtechnology*, Current Applied Physics, 12(6), s. 1387-1412.

30. Dardas D., Kuczyński W., Hoffmann J., Jeżewski W., *Determination of twist elastic constant in antiferroelectric liquid crystals*, Measurement Science and Technology, 22, 2011, s. 85707.
31. Kuczynski W., Dardas D., Nowicka K., *Determination of the bulk rotational viscosity coefficient in a chiral smectic C* liquid crystal*, Phase Transitions, 82(6), 2009, s. 444-451.
32. Dardas D., *Electro-optic and viscoelastic properties of a ferroelectric liquid crystalline binary mixture*, Phase Transitions, 89(4), 2016, s. 368-375.
33. Dardas D., *Tuning the electro-optic and viscoelastic properties of ferroelectric liquid crystalline materials*, Rheologica Acta, 58, 2019, s. 193-201.
34. Diaspro A., Chirico G., Usai C., Ramoino P., Dobrucki J., *Photobleaching*, [w:] *Handbook of biological confocal microscopy*, Springer, Boston (MA) 2006.
35. Pieprzyk S., Yevchenko T., Dardas D., Brańka A.C., *Phase transitions and physical properties by a color texture analysis. Results for liquid crystals*, Journal of Molecular Liquids, 362, 2022, s. 119699.
36. Nowicka K., *Laserowa skaningowa mikroskopia fluorescencyjna konfokalna FLUOVIEW FV1200 IX83*, Instytut Fizyki Molekularnej PAN, Poznań 2010.
37. Chrzumnicka E., *Badanie efektu gościa-gospodarza w jednoosiowych fazach ciekłokrystalicznych metodami spektroskopii optycznej*, rozprawa doktorska, Politechnika Poznańska, Poznań 2002.

Wyodrębnianie i stabilizacja jednorodnego obszaru w układach ciekłokrystalicznych za pomocą kontrolowanego fotowysbielenia laserowego

Streszczenie

Celem pracy było sprawdzenie metody uzyskania dodatkowego efektu granicznego przy użyciu kontrolowanego fotowysbielenia laserowego za pomocą fluorescencyjnego konfokalnego mikroskopu polaryzacyjnego (FCPM) w homogenicznych komórkach ciekłych kryształów. Znajomość właściwości materiałowych ciekłych kryształów i ich wpływu na strukturę, uporządkowanie, charakterystykę danej mezofazy i faz sąsiednich jest niezbędna do projektowania wysokosprawnych elementów optoelektronicznych, takich jak wyświetlacze ciekłokrystaliczne, modulatory światła, apertury czy filtry. Rzadko wyznacza się stałe sprężystości i lepkości, choć są istotne w ocenie przydatności aplikacyjnej materiału. Wykorzystanie właściwości ferroelektrycznych i antyferroelektrycznych smektyków umożliwia poprawę skali szarości, szybkości przełączania, kontrastu, zawartości informacji i wielu innych parametrów charakteryzujących urządzenia do wizualizacji informacji. Opracowana metoda wyznaczania bezwzględnych wartości współczynników liniowego i kwadratowego efektu elektrooptycznego w niskich polach elektrycznych pozwala na wyznaczenie stałych sprężystych (z wartości głębokości modulacji światła) oraz lepkości rotacyjnej (z zależności od częstotliwości) w warunkach przepływu laminarnego i małych odkształceń. Rodzaj i charakter przemian fazowych zachodzących w badanym materiale może mieć decydujący wpływ nie tylko na wartość wyznaczonych współczynników, ale także na ich zależność od temperatury. Dotychczas badane ciekłe kryształy nie pozwalają na wyciągnięcie wniosków dotyczących pełnej etiologii tych zjawisk. Aby uzyskać wyniki jednoznacznie charakteryzujące daną fazę, potrzebny jest materiał jednorodnie zorientowany w całej objętości próbki. Metoda fotowysbielenia laserowego może być dodatkowym sposobem stabilizacji warstw ciekłych kryształów.

Słowa kluczowe: ciekłe kryształy, właściwości elektrooptyczne, fotowysbielenie laserowe, analiza numeryczna

Separation and stabilization of homogeneous area in liquid crystal systems using controlled laser photobleaching

Abstract

The purpose of this work was to test the method to obtain an additional boundary effect using controlled laser photobleaching with the Fluorescence Confocal Polarizing Microscope (FCPM) in homogenous liquid crystals cells.

Knowledge of the material properties of liquid crystals and their influence on the structure, order, characteristics of a given mesophase and adjacent phases is essential for the design of high-performance optoelectronic components such as liquid crystal displays, light modulators, apertures or filters. Elasticity and viscosity

constants are rarely determined, although they are important in assessing the application suitability of the material. The use of ferroelectric and antiferroelectric properties of smectics makes it possible to improve grayscale, switching speed, contrast, information content and many other parameters of information visualization devices. The developed method of determining absolute values of coefficients of linear and quadratic electro-optic effect in low electric fields, allows to determine elastic constants (from light modulation depth values) and rotational viscosity (from frequency dependence), under laminar flow and small deformation conditions. The type and nature of phase transformations occurring in the studied material can have a decisive influence not only on the value of the determined coefficients but also on their temperature dependence. The liquid crystals studied so far do not allow conclusions to be drawn on the full etiology of these phenomena. To obtain results unambiguously characterizing a given phase, one needs material homogeneously oriented in the whole volume of the sample. The laser photobleaching method may be an additional way to stabilize liquid crystal layers.

Keywords: liquid crystals, electrooptical properties, laser photobleaching, numerical analysis

Dezynfekcja i jej oddziaływanie na bakterie ze szczególnym uwzględnieniem form przetrwalnych

1. Wprowadzenie

W wyniku pandemii COVID-19 zaczęto masowo stosować różnorodne środki do dezynfekcji. Pojawiły się one w miejscach użytku publicznego takich jak centra handlowe, sklepy spożywcze czy ośrodki medyczne. Wraz ze wzrostem ich używania, nasunęły się pytania co do bezpieczeństwa oraz wpływu używania dużej ilości środków dezynfekcyjnych na zdrowie człowieka. Podczas wykonywania eksperymentu, mającego zbadać wpływ jednego z takich środków na mikrobiotę dłoni, wykryto jego zanieczyszczenie. Okazało się, że w środku tym bytują bakterie przetrwalnikujące z rodzaju *Bacillus*. Wynik tego doświadczenia postawił pytania dotyczące obecności oraz ewentualnej liczebności i rodzaju występujących mikroorganizmów w dezynfektantach, możliwym rozprzestrzenianiu się bakterii patogennych oraz faktycznego działania dezynfektantów na różne formy bakterii, w szczególności ich formy przetrwalne. Stał się on inspiracją do przeprowadzenia poniższych badań. W pracy tej skupimy się przede wszystkim na formach przetrwalnych bakterii z uwagi na ich naturalną zdolność do przeżywania w niesprzyjających warunkach, np. w obecności dezynfektantów. W niniejszej pracy pojęcie „dezynfekcja” będzie obejmowało odkażanie zarówno powierzchni nieożywionych jak i skóry rąk za pomocą środków chemicznych (dezynfektantów).

2. Cel pracy

Celem niniejszej pracy było przeprowadzenie analizy czystości mikrobiologicznej dezynfektantów pod kątem bakterii antybiotykoopornych oraz potencjalnie patogennych. Materiał do badań został pobrany z różnych miejsc użytku publicznego, z szacunkowym określeniem liczby dezynfektantów zanieczyszczonych mikroorganizmami, uwzględniając miejsca najbardziej narażone na występowanie zanieczyszczeń takimi bakteriami. Drugim celem badań było sprawdzenie działania różnych rodzajów dezynfektantów, także tych dostępnych komercyjnie, na bakterie z rodzaju *Bacillus*, które posiadają zdolność przetrwalnikowania.

¹ aleksandraa.wichrowska@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe Mikrobiologów „Eza”, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, www.sggw.edu.pl.

² izabela.wasowicz99@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe Mikrobiologów „Eza”, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, www.sggw.edu.pl.

³ karolina.dylewska8@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe Mikrobiologów „Eza”, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, www.sggw.edu.pl.

⁴ majakirzyc8@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe Mikrobiologów „Eza”, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, www.sggw.edu.pl.

⁵ wiktoria.wasylko123@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe Mikrobiologów „Eza”, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, www.sggw.edu.pl.

⁶ joanna_banasiewicz@sggw.edu.pl, Katedra Biochemii i Mikrobiologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, www.sggw.edu.pl.

3. Dezynfekcja

3.1. Sposób działania dezynfektantów

Dezynfekcja jest procesem polegającym na zabiciu lub zahamowaniu wzrostu form wegetatywnych drobnoustrojów znajdujących się poza organizmem człowieka. Usuwanie form przetrwalnikujących odbywa się natomiast w procesie sterylizacji [1]. Środki dezynfekcyjne stanowią grupę związków należącą do różnych klas chemicznych. Obejmuje ona np. alkohole, aldehydy, związki utleniające, czwartorzędowe związki amoniowe. Wykazują one aktywność przeciwdrobnoustrojową i biorą udział w procesie dezynfekcji chemicznej. Preparaty dezynfekcyjne dostępne komercyjnie zawierają 1 związek chemiczny lub mieszaninę związków, co prowadzi do zwiększenia działania i skuteczności preparatu [2]. Dezynfektanty mające szerokie spektrum działania bazują głównie na związkach zawierających aktywne formy tlenu oraz aldehydy. Do związków takich należą np. alkohole, czwartorzędowe związki amoniowe, detergenty, chlorowce czy związki kompleksujące [1]. Wyróżnia się wiele mechanizmów działania środków antyseptycznych i dezynfekujących. Jednym z ich celów jest ściana komórkowa mikroorganizmów. Takie działanie wykazuje np. aldehyd glutarowy, który silnie wiąże się z nieprotonowanymi aminami na powierzchni komórki [3]. Substancje takie jak chlorheksydyna, fenole, diaminy wpływają na błonę cytoplazmatyczną komórek, powodując m.in. krzepnięcie cytoplazmy lub wpływają na integralność błon [3]. Środki dezynfekcyjne i antyseptyczne wpływają również na DNA, hamując jego syntezę, powodując pęknięcie nici DNA lub powodując interpelację cząsteczki akrydyny między 2 warstwami par zasad w DNA [3]. Najczęściej stosowane są środki na bazie alkoholu etylowego, alkoholu izopropylowego i *n*-propanolu. Alkohole posiadają zdolność do denaturacji białek, co skutkuje silnym działaniem bakteriobójczym [4]. Szczególnym problemem stają się spory bakteryjne, które stawiają wysokie wymagania dotyczące skuteczności środków dezynfekujących [5]. Wiele środków antyseptycznych może wykazywać niską skuteczność przeciwko zarodnikom, ponieważ nie mają dostępu do miejsc działania, które znajduje się w rdzeniu zarodników [4].

3.2. Bakterie przetrwalnikujące

Wytwarzanie spor jest charakterystyczne dla poszczególnych gatunków bakterii, należących do rzędów *Clostridiales* oraz *Bacillales*. Formy przetrwalnikowe spełniają rolę struktur spoczynkowych pozwalających na przetrzymanie nadzwyczajnie niekorzystnych warunków środowiska, jak np. brak substancji odżywczych. W takiej sytuacji rozpoczyna się proces sporulacji. Niektóre spory odznaczają się ekstremalną opornością między innymi na promieniowanie UV, wysychanie, wysokie ciśnienie, różnorodne środki chemiczne: kwasy, zasady, środki utleniające. Pozwala to na długotrwałe przeżycie komórek bakteryjnych [9, 10]. Spowodowane jest to zahamowaniem aktywności metabolicznej, przy jednoczesnym zachowaniu całego genomu oraz wszystkich mechanizmów potrzebnych do kiełkowania form wegetatywnych na wypadek pojawienia się korzystnych warunków [11]. Endospory wykształciły szereg mechanizmów, cech strukturalnych oraz biochemicznych umożliwiających im ochronę przed uszkodzeniem. Niepodważalnie jednym z elementów kluczowych dla obrony jest płaszcz białkowy otaczający endosporę. Wciąż jednak mało wiadomo o różnorodności jego struktury oraz jej formowania pomiędzy gatunkami [12, 9]. Analizując wytrzymałość endospor na różnorodne czynniki,

można stwierdzić, że są one nieporównywalnie bardziej odporne na dezynfekcję od form wegetatywnych [9, 13]. Spory są w stanie przetrzymać działanie kwasu żołądkowego, co jest istotne w kontekście zdrowia publicznego. Spory *Bacillus cereus* oraz *Clostridium perfringens* są częstymi czynnikami zakażeń układu pokarmowego. Ze względu na wytrzymałość przetrwalników na wiele czynników potrzebne są specjalne metody oraz środki do dezynfekcji i sterylizacji. Szczególnie istotne jest to w kontekście obchodzenia się z pościelą/tkaninami hospitalizowanych pacjentów, zakażonych *Clostridium difficile*. Pomimo ogromnej wytrzymałości spor na różnorodne środki chemiczne, istnieją odczynniki pozwalające na zlikwidowanie przetrwalników. Należy jednak pamiętać o dostosowaniu metod do gatunku bakterii. Popularną techniką dezynfekcji jest chlorowanie, które jednak nie jest skuteczne przy wszystkich szczepach *Bacillus* [11]. To właśnie z uwagi na wytrzymałość spor są one dużym problemem w powszechnej dezynfekcji, gdzie większość używanych środków nie działa na nie w sposób bójczy.

3.3. Zagrożenia płynące z dezynfekcji

Dezynfektanty niosą różne zagrożenia związane z ich użytkowaniem. W zależności od typu substancji oraz jej przeznaczenia można zaobserwować różne objawy zdrowotne. Szeroko stosowany w dezynfekcji alkohol etylowy może powodować suchość skóry oraz długotrwałe podrażnienia. Doświadczenia przeprowadzane na zwierzętach udowodniły udział etanolu w nowotworzeniu po uprzednim stosowaniu na skórę [6]. Natomiast wpływ na nowotwory u ludzi nie jest jednoznacznie oceniony [7]. Etanol stosowany na skórę wiąże się z rozwojem łuszczycy, a przewlekłe używanie go wpływa na rozwój martwicznych infekcji ran [6]. Alkohol etylowy stosowany na zranioną skórę jest bardzo szybko wchłaniany oraz wykrywany w krwioobiegu [6]. Etanol wpływa na zwiększenie przepuszczalności skóry, co skutecznie obniża ochronę przed wnikaniem patogenów [7]. Przewlekłe i zbyt częste używanie środków na bazie etanolu może skutkować poważnymi problemami zdrowotnymi [7]. Utleniacze, czyli środki na bazie nadtlenków, powodują różne objawy w zależności od miejsca ich oddziaływania. W wyniku wdychania 3% nadtlenku wodoru może dojść do zatoru powietrznego. Natomiast kontakt 3% nadtlenku wodoru ze skórą może powodować łagodne podrażnienie skóry i błon śluzowych [8]. Środki na bazie formaldehydu, np. roztwór wodny formaldehydu, jakim jest formalina, są to środki dezynfekujące o bardzo intensywnym zapachu. Uważane są za czynniki rakotwórcze, a ich opary mogą powodować trudności w oddychaniu. Kontakt ze skórą skutkuje podrażnieniem oraz zapaleniem [8]. Środki dezynfekcyjne zyskały dużą popularność wraz z wybuchem pandemii COVID-19. Coraz częstsze użytkowanie tych substancji przyczynia się do powstania wielu niekorzystnych schorzeń. Należy zatem pamiętać o umiarkowanym dawkowaniu oraz o potencjalnych zagrożeniach wynikających z nadmiernej ekspozycji na szkodliwe dla nas substancje.

3.4. Antybiotykooporność

Antybiotykooporność jest zjawiskiem, które ujawniło się wraz z odkryciem antybiotyków [14]. W dzisiejszych czasach wystąpił znaczny wzrost oporności na antybiotyki, co jest spowodowane niewłaściwym stosowaniem tych substancji [15]. Prognozy ekspertów dotyczące tego zjawiska sugerują, że do 2050 roku oporność na antybiotyki może doprowadzić do większej liczby zgonów niż w wyniku chorób nowotworowych [16]. Coraz większe ograniczenie dostępności leków działających na mikroorganizmy jest siłą napę-

dową do badań nad środkami przeciwdrobnoustrojowymi [14]. Antybiotykooporność determinowana jest genetycznie i pojawia się w wyniku mutacji zachodzących w genomie bakteryjnym. Szczególną rolę odgrywają plazmidy niosące geny oporności [17]. Różnorodne środki dezynfekcyjne działające na komórki bakteryjne mogą wpływać na pojawianie się oporności. Obecność detergentów oraz dezynfektantów przyczynia się do selekcji szczepów opornych na wiele czynników. Stres spowodowany niekorzystnymi warunkami sprzyja powstawaniu mutacji, które następnie mogą skutkować obniżeniem wrażliwości na dane substancje [18]. Stosowanie środków przeciwdrobnoustrojowych przyczynia się do powstania oporności krzyżowej. Jest to zjawisko szczególnie niebezpieczne, ponieważ coraz częstsze stosowanie chemioterapeutyków prowadzi do równoczesnego zwiększenia oporności na środki dezynfekcyjne wśród drobnoustrojów [17]. Zdarzenia te skłaniają do refleksji nad nadmiernym stosowaniem środków dezynfekcyjnych w dzisiejszych czasach.

4. Materiały i metody

4.1. Etap 1

Materiałem użytym w pierwszym etapie badania były próby dezynfektantów pobrane z 30 miejsc użytku publicznego. Należały do nich m.in. ośrodki medyczne (10 prób), centra handlowe (5 prób), hipermarkety (5 prób), uczelnie wyższe (5 prób), biura (3 próby), apteka (1 próba), stacja benzynowa (1 próba) oraz sklep budowlany (1 próba). Środki te zbierane były do sterylnych pojemników typu falcon, których wieczka dodatkowo zabezpieczono parafilmem i przechowywano w temperaturze pokojowej do czasu przeprowadzenia badań. Próby wysiane zostały do podłoża LB w formie płynnej (w stosunku objętościowym 1 ml próby do 9 ml pożywki) jak i na podłoże zestalone za pomocą agaru bakteriologicznego (200 μ l próby rozprowadzono za pomocą głaszczki na powierzchni podłoża). W przypadku posiewu na szalki, wykonany został też dodatkowy wariant uwzględniający uprzednie rozcieńczenie próbek (100 μ l próby do 900 μ l rozcieńczalnika) – poprzez wykonanie posiewu odpowiednio rozcieńczonych próbek o objętości 200 μ l metodą opisaną powyżej. Wszystkie warianty posiewów wykonano w 2 powtórzeniach ze względu na inkubację prowadzoną zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych (te stworzono poprzez zalanie zaszczerpionych pożywek płynnych warstwą parafiny, a w przypadku pożywek stałych poprzez umieszczanie ich w pojemnikach z zestawem generującym atmosferę beztlenową), w temperaturze 28°C. Po 24/48 h inkubacji obserwowano ewentualne zmętnienie pożywek oraz wzrost na szalkach. Rezultaty zapisywano, zliczając kolonie bakteryjne oraz opisując charakterystyczne cechy ich wzrostu. W kolejnym etapie za pomocą posiewów redukcyjnych dążono do uzyskania czystej kultury bakterii. Wygląd morfologiczny kolonii oceniano makroskopowo, a morfologię komórek mikroskopowo przy użyciu barwienia metodą Grama. Pozwoliło to na wstępną, bardzo ogólną klasyfikację wyizolowanych drobnoustrojów. Na podstawie uzyskanych danych wytypowano z nich 11, które sprawdzono pod względem oporności na wybrane antybiotyki z różnych grup (tab. 1). Antybiogramy te wykonano za pomocą metody krążkowo-dyfuzyjnej na podłożu stałym LB, z wykorzystaniem gotowych, dostępnych komercyjnie krążków antybiotykowych.

Tabela 1. Antybiotyki i chemioterapeutyki użyte do wykonania antybiogramu

Grupa antybiotyków	Nazwa antybiotyków
Aminoglikozydy	kanamycyna, gentamycyna
Ansamycyny	ryfampicyna
Cefalosporyny	cefuroksym, cefalotyna
Glikopeptydy	wankomycyna
Penicyliny	amoksycylina, penicylina, piperacylina
Pochodne kwasu fosfonowego	fosfomycyna
Polimyksyny	polimyksyna
Chemioterapeutyki	nitrofurantoina, trimetoprim

Źródło: opracowanie własne.

4.2. Etap 2

Drugi etap doświadczenia skupiał się na sprawdzeniu przeżywalności wybranego izolatu z rodzaju *Bacillus* po jego celowym wprowadzeniu do wybranych dezynfektantów. Izolat ten uzyskano podczas wykonywania eksperymentu, mającego zbadać wpływ jednego z takich środków na mikrobiotę dłoni. Wysoka oporność spor tego izolatu na niesprzyjające warunki skierowała zainteresowanie względem jego przeżywalności w innych dezynfektantach. Uprzednio dokonano próby jego identyfikacji za pomocą testu API 20E oraz 50CH. Wykorzystywanymi w badaniu dezynfektantami były: 0,5% chloramina, 70% alkohol propylowy, dostępne komercyjnie dezynfektanty (dezynfektant pochodzenia drogowego; dezynfektant posiadający świadectwa badań potwierdzające jego skuteczność: EN 1500, EN 14476, 1650, 13704, 14348; dezynfektant przeznaczony i używany powszechnie w dezynfekcji chirurgicznej), 70% alkohol etylowy oraz jego wersja z zastosowaniem modyfikacji pH o wartościach 1-2; 3-4; 8-9; 10-11 ustalonych za pomocą HCl i NaOH. Wartości pH wybrane zostały na podstawie danych literaturowych opisujących zmianę działania tego związku w zależności od wartości tego parametru. Nerandzic i wsp. w swoim badaniu z 2015 roku wykazali, że skrajne wartości pH powodują znaczne zmniejszenie przeżywalności bakterii przetrwalnikujących z rodzaju *Clostridium*. Względem badanych równocześnie *Bacillus thuringiensis* oraz *Bacillus subtilis* nie zauważono aż tak znaczącej redukcji przetrwalników [4]. Idea tego badania, pomimo braku zadowalających wyników dla dwóch szczepów z rodzaju *Bacillus*, skłoniła do wykorzystania w niniejszym doświadczeniu podobnie zmodyfikowanego alkoholu. Do zaszczepienia wszystkich rodzajów dezynfektantów użyto zarówno kolonii 24-godzinnej, w której to przeważały formy wegetatywne, jak i starszej 72-godzinnej, składającej się już z form przetrwalnikujących wspomnianych wcześniej bakterii. Próby wysiewano na podłoże LB zestalone za pomocą agaru bakteriologicznego w różnych odstępach czasowych: natychmiast po zaszczepieniu zawiesiną bakterii, po 1 godzinie oraz po 4 dobach po zaszczepieniu. Szalki inkubowano w warunkach tlenowych w temperaturze 28°C. Po 24/48 h inkubacji obserwowano i zliczano liczbę kolonii bakteryjnych wyrosłych na podłożu.

5. Wyniki

5.1. Etap 1

W pierwszym etapie doświadczenia wykazano wzrost 17 spośród 31 zebranych prób. Do miejsc, z których je pobrano, należały głównie ośrodki medyczne, uczelnie wyższe, hipermarkety oraz pojedyncze próby z biura i centrum handlowego. Szczegółowy opis miejsc wykazano w tabeli 2. W 14 z 17 prób wykryte zostały bakterie względnie do siebie podobne, morfologią wzrostu wskazujące na bakterie przetrwalnikujące. Zakwalifikowane zostały one później do rodzaju *Bacillus*. Zupełnie inną morfologią wzrostu odznaczały się 2 próby sugerujące wstępne rozpoznanie jako bakterie nieprzetrwalnikujące. Wyłącznie 1 próba charakteryzowała się koloniami mieszanymi, reprezentującymi zarówno bakterie przetrwalnikujące, jak i te nieposiadające zdolności do wytwarzania spor. Wyniki wykonanych posiewów ilościowych pozwoliły na określenie szacunkowej liczby mikroorganizmów i/lub ich form przetrwalnych bytujących w zebranych płynach dezynfekcyjnych. Ilość ta oscylowała w przedziale od 50 jtk/ml do 250 jtk/ml w zależności od danej próby.

5.1.1. Identyfikacja

Uzyskane izolaty poddano wstępnej próbie identyfikacji. W tym celu jako pierwsza przeprowadzona została obserwacja morfologii kolonii bakteryjnych. Oceniano ich wielkość, kształt, brzeg, powierzchnię, wyniosłość ponad powierzchnię podłoża, kolor, przejrzystość oraz konsystencję. Znaczna większość izolatów charakteryzowała się podobnym wzrostem. Obserwowano względem ich kolonii: dużą wielkość, nieregularny kształt i brzeg, matową lub błyszczącą i pomarszczoną powierzchnię, wyniosłość przypominającą wulkan, kolor biały do bardzo jasnokremowego, brak przejrzystości i śluzowatą konsystencję. Morfologia ta wskazywała wstępnie na rodzaj *Bacillus*. Jako drugą obserwowano morfologię samych komórek metodą mikroskopową, po wcześniejszym wybarwieniu preparatów metodą Grama. Komórki różniły się między sobą znacząco. Przedstawione na rysunku 1 zdjęcia prób nr 1, 2 i 15 ukazują zarówno różnice wielkości, jak i oraz kształtu (od krótkiego i owalnego do typowej długiej laseczki). Różne było również położenie spory we wnętrzu komórki – sferyczne lub centralne. Obecność wymienionych różnic morfologicznych każe podejrzewać, że izolaty te, choć należą do wspólnego rodzaju, różnią się między sobą gatunkowo.

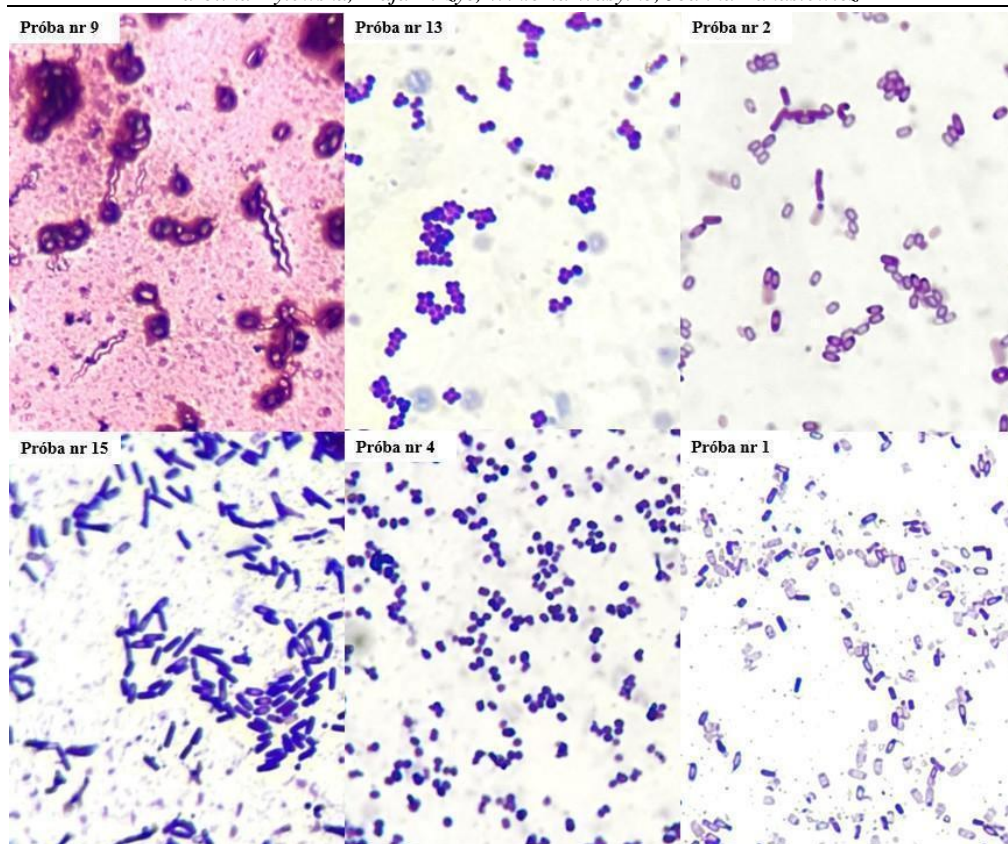
W 2 próbach spośród 17 zaobserwowano inną morfologię wzrostu. Kolonie charakteryzowały się: bardzo drobnymi rozmiarami, okrągłym kształtem, równym brzegiem, gładką i błyszczącą powierzchnią, niewielką wyniosłością, białym lub kremowym kolorem, brakiem przejrzystości oraz otoczeniem kolonii przezroczystą, śluzowatą substancją. W preparacie mikroskopowym obserwowano Gram+ ziarniaki niewielkich rozmiarów, o różnym ułożeniu. Ziarniaki z pierwszego z tych izolatów nie układały się w żadne typowe struktury, komórki występowały w formie pojedynczej. Komórki z drugiego izolatu tworzyły natomiast struktury o kształcie gron.

Ostatnia z prób, z której uzyskano wzrost, cechowała się wyglądem kolonii charakterystycznym dla rodzaju *Bacillus*, opisanym powyżej. Interesującym jest jednak fakt, że w obrazie mikroskopowym oprócz typowych pałeczek lub ziarniako-pałeczek widoczne były komórki o spiralnym kształcie. Odznaczały się one dużym rozmiarem, brakiem wybarwienia metodą Grama i lekko opalizującym wnętrzem. Bakterie te zaklasyfikowano wstępnie do bakterii spiralnych.

Tabela 2. Wykaz pobranych prób oraz ich charakterystyka

Nr	Miejsce pochodzenia próbki	Opis wykrytej bakterii
1	Uczelnia 1	bakterie posiadające zdolność do przetrwalnikowania, z rodzaju <i>Bacillus</i>
2	Uczelnia 2	bakterie posiadające zdolność do przetrwalnikowania, z rodzaju <i>Bacillus</i>
3	Uczelnia 3	bakterie posiadające zdolność do przetrwalnikowania, z rodzaju <i>Bacillus</i>
4	Uczelnia 4	Bakterie o morfologii ziarniaków, nie łączące się w charakterystyczne struktury
5	Uczelnia 5	bakterie posiadające zdolność do przetrwalnikowania, z rodzaju <i>Bacillus</i>
6	Ośrodek medyczny 1	bakterie posiadające zdolność do przetrwalnikowania, z rodzaju <i>Bacillus</i>
7	Ośrodek medyczny 2	bakterie posiadające zdolność do przetrwalnikowania, z rodzaju <i>Bacillus</i>
8	Ośrodek medyczny 3	bakterie posiadające zdolność do przetrwalnikowania, z rodzaju <i>Bacillus</i>
9	Ośrodek medyczny 4	hodowla mieszana: bakterie posiadające zdolność do przetrwalnikowania, z rodzaju <i>Bacillus</i> oraz bakterie o kształcie spiralnym
10	Ośrodek medyczny 5	bakterie posiadające zdolność do przetrwalnikowania, z rodzaju <i>Bacillus</i>
11	Ośrodek medyczny 6	bakterie posiadające zdolność do przetrwalnikowania, z rodzaju <i>Bacillus</i>
12	Hipermarket 1	bakterie posiadające zdolność do przetrwalnikowania, z rodzaju <i>Bacillus</i>
13	Hipermarket 2	bakterie o morfologii ziarniaków, łączące się w charakterystyczne struktury – grona
14	Hipermarket 3	bakterie posiadające zdolność do przetrwalnikowania, z rodzaju <i>Bacillus</i>
15	Hipermarket 4	bakterie posiadające zdolność do przetrwalnikowania, z rodzaju <i>Bacillus</i>
16	Centrum handlowe	bakterie posiadające zdolność do przetrwalnikowania, z rodzaju <i>Bacillus</i>
17	Biuro	bakterie posiadające zdolność do przetrwalnikowania, z rodzaju <i>Bacillus</i>

Źródło: opracowanie własne.



Rysunek 1. Preparaty mikroskopowe uzyskane za pomocą barwienia metodą Grama uzyskanych izolatów bakteryjnych [opracowanie własne]

5.1.2. Antybiogram

Antybiotykooporność zdecydowano się sprawdzić dla 11 wybranych izolatów, które zostały uzyskane z poprzedniego etapu eksperymentu dotyczącego miejsc użyteczności publicznej. W tym celu wykorzystano krążki nasączone antybiotykami należącymi do różnych grup. Ze względu na brak wytycznych EUCAST do oznaczania lekowrażliwości dla większości z uzyskanych izolatów, zdecydowano się określać oporność tylko w przypadku całkowitego braku strefy zahamowania wzrostu, w wyniku czego podane w tabeli 3 oporności są jedynie orientacyjne, a ich faktyczna liczba jest najprawdopodobniej większa.

Tabela 3. Oznaczenie wrażliwości na antybiotyki wybranych izolatów

Miejsce pobrania próby	Antybiotyki												
	FOT	CXM	F/M	VA	CF	AMC	PIP	SXT	PB	K	CN	RA	P
Ośrodek medyczny 1	R	R	S	S	R	S	S	R	-	-	-	-	-
Ośrodek medyczny 2	R	R	S	S	R	S	S	S	-	-	-	-	-
Ośrodek medyczny 3	R	R	S	S	R	S	S	S	-	-	-	-	-

Dezynfekcja i jej oddziaływanie na bakterie ze szczególnym uwzględnieniem form przetrwalnych

Ośrodek medyczny 5	R	R	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	R
Ośrodek medyczny 6	R	R	S	S	R	S	S	S	-	-	-	-	-
Uczelnia 1	R	R	S	S	R	S	S	S	-	-	-	-	-
Uczelnia 2	R	R	S	S	R	R	S	R	-	-	-	-	-
Uczelnia 3	R	R	S	S	R	R	R	S	-	-	-	-	-
Uczelnia 4	R	R	S	S	R	R	R	S	-	-	-	-	-
Hipermarket 2	R	R	S	S	R	S	S	S	R	S	R	S	R
Hipermarket 3	R	R	S	S	R	R	R	S	R	S	S	S	R

Zastosowane skróty: FOT – fosfomycyna, CXM – cefuroksym, F/M – nitrofurantoina, VA – wankomycyna, CF – cefalotyna, AMC – amoksycylina, PIP – piperacylina, SXT – trimetoprim, PB – polimyksyna, K – kanamycyna, CN – gentamycyna, RA – rifampicyna, P – penicylina, R – oporny (ang. *resistant*), S – wrażliwy (ang. *sensitive*)

Źródło: opracowanie własne.

Uzyskane wyniki wykazały, że każdy z badanych izolatów posiadał oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe. Większość z nich wykazywała oporność na co najmniej 1 z 3 lub więcej różnych grup antybiotyków. Potwierdza to hipotezę, że środki dezynfekcyjne mogą wpływać na szerzenie się oporności wśród bakterii. Należy jednak podkreślić, że szerzenie się antybiotykooporności jest złożonym problemem. Oporność na antybiotyki uzyskanych izolatów może być spowodowana również przez inne czynniki.

5.2. Etap 2

Drugi etap doświadczenia został przeprowadzony przy użyciu izolatu bakteryjnego pochodzącego z wykonanego wcześniej eksperymentu sprawdzającego mikrobiotę dłoni. Eksperyment charakteryzował się zastosowaniem 2 wariantów izolatu z rodzaju *Bacillus* (jego formy wegetatywnej oraz przetrwalnikującej). Za pomocą testów API 20E oraz 50CH przeprowadzono wstępne badania przynależności gatunkowej wykorzystanego izolatu. Na ich podstawie nie udało się jednoznacznie zidentyfikować gatunku. Największą wartość procentową uzyskał *Bacillus amyloliquefaciens*, który należy do grupy *B. subtilis*. Jest to obszerna grupa bakterii, w której skład wchodzi mikroorganizmy bardzo zbliżone do siebie pod względem genetycznym. Oba warianty izolatu zostały zaszczerpione w przygotowanych różnych rodzajach dezynfektantów (tab. 4). Analizując wyniki dla wariantu z wykorzystaniem form przetrwalnikujących, w 100% prób, niezależnie od punktu czasowego wykonanego wysiewu oraz stosowanego dezynfektantu, zaobserwowano wzrost niepoliczalnej liczby kolonii. Potwierdza to, że używane powszechnie dezynfektanty nie wykazują działania przeciw bakteriom przetrwalnikującym. Zaszczepienie dezynfektantów formą wegetatywną zobrazowało nieliczny wzrostu mikroorganizmów w porównaniu do form przetrwalnikujących. Skrajne wartości pH 70% alkoholu (tj. pH = 1-2 oraz pH = 10-11) wykazały największe zdolności bakteriobójcze. Powszechnie używany etanol 70% wykazał słabą efektywność dezynfekcji. Stosowanie 70% alkoholu propylowego również nie stanowiło dobrego sposobu do usuwania form wegetatywnych izolatu. Dezynfektant określany jako „działający na spory” w obu wariantach doświadczenia cechował się niepoliczalnym wzrostem kolonii. Interesujący jest fakt gorszego działania

środka komercyjnego w porównaniu z próbą kontrolną. Najbardziej efektywnym środkiem okazał się klasyczny dezynfektant pochodzący z drogerii, który zadziałał tak samo dobrze jak specjalistyczny środek do odkażania skóry przed operacjami. Wszystkie uzyskane wyniki zostały dokładnie przedstawione w tabeli 4.

Tabela 4. Wyniki 2 etapu doświadczenia

Wariant doświadczenia		Forma wegetatywna			Forma przetrwalnikująca		
Czas wysiewu		natychmiast	1h	4 doba	natychmiast	1h	4 doba
1.	Dezynfektant komercyjny działający na spory	N	N	N	N	N	N
2.	Etanol pH 1-2	2P	brak	0	N	N	N
3.	Etanol pH 3-4	brak	brak	2W	N	N	N
4.	Etanol pH 8-9	1P	1P i 1W	2P	N	N	N
5.	Etanol pH 10-11	1P	1P	0	N	N	N
6.	Etanol 70%	ok. 50W	ok. 30W	2P	N	N	N
7.	Preparatem do odkażania skóry przed operacjami	brak	brak	1P	N	N	N
8.	Dezynfektant komercyjny	brak	brak	1P	N	N	N
9.	Propanol 70%	1P	1P	19P	N	N	N
10.	0,5% Chloramina	brak	brak	7P	N	N	N
kontrola		30W	13W	2W	N	N	N

Zastosowane skróty: N – niepoliczalne, P – formy przetrwalnikujące, W – formy wegetatywne

Źródło: opracowanie własne.

6. Wnioski

Należy jednoznacznie stwierdzić, że skuteczność testowanych dezynfektantów jest zaskakująco niska. Zaskakujące jest najmniej efektywne działanie specjalistycznego dezynfektantu komercyjnego, który z przeznaczenia miał wyróżniać się działaniem sporobójczym. Konieczne jest rozpowszechnianie wiedzy odnośnie do ewentualnych zagrożeń płynących z wykorzystywania publicznie dostępnych dezynfektantów, mające na celu uświadomienie społeczeństwa na temat skuteczności ich działania, z dużym naciskiem na zapoznanie się z możliwym przeżywaniem w nich drobnoustrojów. Rezultaty powyższych badań wskazują na potrzebę kontrolowania sterylności dezynfektantów, ze szczególnym uwzględnieniem miejsc newralgicznych, takich jak choćby ośrodki medyczne. Zanieczyszczenia mikrobiologiczne w płynach mogą wynikać z braku zachowania zasad aseptyki przygotowania oraz uzupełniania dystrybutorów. Wnętrze dystrybutorów może być niesterylne, a na ich powierzchni mogą tworzyć się biofilmy. Jedną z tez postawionych na podstawie przeprowadzonych badań jest taka, że bakterie nieprzetrwalni-

kujące mogą przeżywać w dystrybutorach właśnie dzięki umiejętności tworzenia biofilmów. Ciekawym wynikiem jest wyizolowanie hodowli mieszanej bakterii z rodzaju *Bacillus* oraz *Spirillum*. Możliwe, że dzięki współistnieniu w postaci biofilmu bakterie nieprzetrwalikujące mogą nabyć większą oporność na tego typu środki. Wyniki niniejszego eksperymentu wykazały, że nie powinno się przyjmować odkażania z wykorzystaniem opisywanych środków za całkowicie skuteczną metodę zapobiegania rozprzestrzenianiu się mikroorganizmów, w tym tych potencjalnie patogennych, co obecnie większą część społeczeństwa bierze za pewnik.

7. Podsumowanie

Przedstawiona praca wskazuje na potrzebę poszerzenia naszej wiedzy odnośnie do wpływu dezynfektantów na rozwój i rozprzestrzenianie oporności na antybiotyki wśród mikroorganizmów, a także możliwości przenoszenia bakterii patogennych. Środki te, które zaczęto na masową skalę wykorzystywać w czasie pandemii COVID-19, mogą nie być dla ich użytkowników w pełni bezpieczne. Obecność różnych mikroorganizmów w tych preparatach okazuje się być powszechna. Szczególnie alarmujący powinien być fakt zanieczyszczenia dezynfektantów w szpitalach i innych medycznych placówkach. Bakterie w nich obecne mogą stanowić zagrożenie przede wszystkim dla pacjentów o obniżonej odporności, zwłaszcza jeżeli szczepy te wykazują oporność na wiele antybiotyków z różnych grup. Istotne jest również podkreślenie, że w zebranych dezynfektantach mogły znajdować się też inne gatunki mikroorganizmów, w tym potencjalnie patogenne. Wymagać one mogły specjalnych podłoży i/lub odpowiednio innych warunków inkubacji, przez co nie zostały wykryte w przeprowadzonym doświadczeniu. Oczywiście jest to jedynie hipoteza, choć prawdopodobieństwo jej potwierdzenia wydaje się bardzo wysokie. Niepokojącym aspektem jest również zadziwiająco słabe działanie przetestowanych dezynfektantów na formy wegetatywne bakterii, na których eliminacji powinny się one skupiać. Żaden, nawet specyficzny dezynfektant przeznaczony do likwidacji form przetrwalnych, nie radzi sobie z neutralizacją spor. Wyniki te kwestionują więc skuteczność dezynfekcji i jej bezpieczeństwo oraz sugerują rozważenie przypuszczenia, iż dezynfektanty i ich dystrybutory nie są/stają się rezerwuarem danych gatunków bakterii i innych mikroorganizmów. Sama obecność form przetrwalnych bakterii z uwagi na ich powszechne występowanie w środowisku nie jest na tyle alarmująca jak wykazana w przebiegu badania możliwość wchodzenia przez nie w symbiozę z innymi rodzajami bakterii, np. w formie biofilmu. Może dawać im ona możliwość przetrwania, której naturalnie nie posiadają, w środkach dezynfekcyjnych.

Uzyskane wyniki i wysnute wnioski dotyczące powyższych badań wskazują, że temat ten jest wart rozważenia w kontekście przyszłych podobnych prac. Względem dalszych etapów niniejszej pracy planowana jest dokładna identyfikacja gatunkowa uzyskanych z próbek izolatów. Określenie przynależności taksonomicznej mogłoby wstępnie wskazać m.in. na zagrożenie względem ich potencjalnej patogenności. Planowane jest również przez autorów doświadczalne sprawdzenie żywotności zarówno przetrwalnikujących, jak i nieprzetrwalikujących bakterii występujących w postaci biofilmu na działanie wybranych dezynfektantów o różnorodnym składzie. Ważnym tematem badań staje się również sprawdzenie czystości samych dystrybutorów, zwłaszcza ich wnętrza. Powierzchnie wewnętrzne pojemników, jak też mechaniczne części odpowiedzialne za dozowanie dezynfektantów, mające z nimi styczność, mogą bowiem stanowić miejsce

namnażania bakterii. Szczególnie niepokojące może być tworzenie się na tych powierzchniach biofilmów bakteryjnych, które ze względu na charakterystyczny wzrost i właściwości z tym związane mogą wykazywać się mniejszą wrażliwością na środki dezynfekcyjne. Innym interesującym zagadnieniem jest sprawdzenie wpływu długotrwałego użytkowania dezynfektantów na mikroflorę dłoni, tj. czy istnieje możliwość trwałej zmiany składu gatunkowego wynikającej z wprowadzenia bakterii wraz z dezynfektantem.

Niniejsze badania stanowią dopiero wstępną analizę. Pokazują one, jak obszerne, ważne dla zdrowia i bezpieczeństwa mogą być przyszłe prace wykonane w obrębie tego tematu.

Podziękowania

Praca została wykonana w projekcie grantowym SGGW dla Kół Naukowych pt. „Analiza oporności form przetrwalnikowych bakterii na różne środki dezynfekcyjne”.

Literatura

1. Olesiak P., Sępnia L., *Skuteczność wybranych związków dezynfekcyjnych wobec przetrwalników Bacillus*, Inżynieria i Ochrona Środowiska, 15, 2021, s. 41-50.
2. Książczyk M., Krzyżewska-Dudek E., Futoma-Kołoch B., Bugla-Płoskońska G., *Disinfectants – bacterial cells interactions in the view of hygiene and public health*, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 69, 2015, s. 1042-1055.
3. McDonnell G., Russell A.D., *Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance*, Clinical Microbiology Reviews, 12, 1999, s. 147-179.
4. Nerandzic M.M., Sunkesula V.C.K., Setlow P., Donskey C.J., *Unlocking the sporicidal potential of ethanol: induced sporicidal activity of ethanol against clostridium difficile and bacillus spores under altered physical and chemical conditions*, PLoS One, 10, 2015.
5. Papp S., Kimmerl K., Gatz J., Laue M., Grunow R., Kaspari O., *Evaluation of sporicidal disinfectants for the disinfection of personal protective equipment during biological hazards*, Health Security, 18, 2020, s. 36-48.
6. Lachenmeier D.W., *Safety evaluation of topical applications of ethanol on the skin and inside the oral cavity*, Journal of Occupational Medicine and Toxicology, 3, 2008, s. 26.
7. Mahmood A., Egan M., Pervez S., Alghamdi H.A., Tabinda A.B., Yasar A., Brindhadevi K., Pugazhendhi A., *COVID-19 and frequent use of hand sanitizers; human health and environmental hazards by exposure pathways*, Science of The Total Environment, 742, 2020, s. 140561.
8. Ghafoor D., Khan Z., Khan A., Ualiyeva D., Zaman N., *Excessive use of disinfectants against COVID-19 posing a potential threat to living beings*, Current Research in Toxicology, 2, 2021, s. 159-168.
9. McKenney P., Driks A., Eichenberger P., *The Bacillus subtilis endospore: assembly and functions of the multilayered coat*, Nat Rev Microbiol, 11, 2013, s. 33-44.
10. Setlow P., Christie G., *What's new and notable in bacterial spore killing!*, World J Microbiol Biotechnol, 37, 2021, s. 144.
11. Malyshev D., Dahlberg T., Wiklund K., Andersson P.O., Henriksson S., Andersson M., *Mode of action of disinfection chemicals on the bacterial spore structure and their raman spectra*, Analytical Chemistry, 93, 2021, s. 3146-3153.
12. Leggett M.J., McDonnell G., Denyer S.P., Setlow P., Maillard, J.Y., *Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance*, Journal of Applied Microbiology, 113, 2012, s. 485-498.
13. Cho W.I., Chung M.S., *Bacillus spores: a review of their properties and inactivation processing technologies*, Food Sci Biotechnol, 6, 2020, s. 1447-1461.

14. Żywicka A., Pytką M., Makaruk M., Szalach M., *Rosnąca antybiotykooporność wśród bakterii wyzwaniem XXI wieku*, [w:] Kondracki R., Matejuk M. (red.), *Wyzwania bezpieczeństwa na początku trzeciej dekady XXI wieku*, Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Przyrodniczo-Humanistycznego w Siedlcach, Siedlce 2021, s.87-99
15. Zhang X., Wang X., Bao Y., Shen Z., Xu Y., Wang B., Zhang H., Guan T., He Y., *Phase contrast image-based rapid antimicrobial susceptibility testing of bacteria in liquid culture media*, *Sensors*, 23(1), 2022, s. 59.
16. O'Neill J., *Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations*, Review on Antimicrobial Resistance, 2016, s. 80.
17. Stefańska J., *Oporność gronkowców złośliwych na środki przeciwbakteryjne*, *Prospects in Pharmaceutical Sciences*, 1(3), 2003, s. 18-24.
18. Skarżyńska M., Zając M., Wasyl D., *antibiotics and bacteria: mechanisms of action and resistance strategies*, *Postępy Mikrobiologii – Advancements of Microbiology*, 59(1), 2020, s. 49-62.

Dezynfekcja i jej oddziaływanie na bakterie ze szczególnym uwzględnieniem form przetrwalnych

Streszczenie

W wyniku wybuchu pandemii COVID-19 dezynfekcja stała się powszechniejsza niż kiedykolwiek, a dystrybutory z dezynfektantami zaczęły się pojawiać w większości miejsc użytku publicznego. W związku z ich upowszechnieniem pojawiły się pytania dotyczące bezpieczeństwa dezynfektantów. Tego, jakie może nieść za sobą skutki ich masowe używanie oraz sterylności i działania bakteriobójczego powszechnie stosowanych dezynfektantów. Przedstawiane w ramach tej pracy badania skupiały się na 2 etapach. Pierwszy z nich zakładał sprawdzenie czystości mikrobiologicznej ogólnodostępnych dezynfektantów, natomiast 2. skupiał się na działaniu najpowszechniejszych ich form na bakterie posiadające zdolność do przetrwalnikowania. Do przeprowadzenia badań użyto podstawowych metod mikrobiologicznych takich jak: hodowla prób w podłożu LB, identyfikacja makroskopowa i mikroskopowa oraz antybiogram z użyciem metody krążkowo-dyfuzyjnej. Na podstawie wyników badań dotyczących czystości mikrobiologicznej dezynfektantów wykryto zanieczyszczenia 54% z nich, w tym większość bakteriami posiadającymi zdolność do przetrwalnikowania. W 2. etapie doświadczenia, który miał na celu porównanie najczęściej stosowanych form dezynfektantów, wykazano ich bardzo słabe działanie względem form przetrwalnych, w tym również dezynfektantów dla nich dedykowanych. Przeprowadzone badania pokazują, że środki dezynfekcyjne nie zawsze są sterylne, a ich działanie często nie jest takie, jak zakładamy. Duża część społeczeństwa jest przekonana o ich silnym działaniu względem wszystkich form bakterii, co może powodować różnorakie zaniechania przy obchodzeniu się z dezynfektantami i np. prowadzić do rozwoju biofilmów czy kontaminacji tymi drobnoustrojami. Badania te pokazały, że należy upowszechniać wiedzę o tym, jak obchodzić się z dezynfektantami, aby zachować ich sterylność. Należy się zastanowić się również, czy takie upowszechnienie dezynfekcji, jakie aktualnie obserwujemy, jest zjawiskiem pozytywnym i czy zagrożenia z niego płynące nie przewyższają zalet.

Słowa kluczowe: dezynfekcja, antybiotykooporność, bakterie przetrwalnikujące

Disinfection and its impact on bacteria with particular emphasis on persistent forms

Abstract

As a result of the outbreak of the COVID-19 pandemic, disinfection has become more common than ever, and dispensers with disinfectants have started to appear in most public places. Due to their dissemination, questions about the safety of disinfectants have arisen. The effects of their mass use and the sterility and bactericidal effect of commonly used disinfectants. The research presented in this work focused on two stages. The first of them involved checking the microbiological purity of widely available disinfectants, while the second focused on the effect of their most common forms on bacteria capable of spore-forming. Basic microbiological methods were used to carry out the tests, such as: culture of samples in/on LB medium, macroscopic and microscopic identification and antibiogram using the disc diffusion method. Based on the results of microbiological purity tests, 54% of them were found to be contaminated, most of them with spore-forming bacteria. In the second stage of the experiment, which was aimed at comparing the most commonly used forms of disinfectants, their very weak effect was shown in relation to persistent forms, including

disinfectants dedicated to them. The conducted research shows that disinfectants are not always sterile, and their effect is often not as expected. A large part of the society is convinced of their strong action against all forms of bacteria, which can cause various omissions when handling disinfectants and, for example, lead to the development of biofilms or contamination with these microorganisms. These studies have shown that knowledge should be disseminated on how to handle disinfectants in order to maintain their sterility. It should also be considered whether the dissemination of disinfection as we are currently observing is a positive phenomenon and whether the risks arising from it do not outweigh the advantages.

Keywords: disinfection, antibiotic resistance, spore-forming bacteria

Opracowywanie alternatywnej metody identyfikacji miodów

1. Wprowadzenie

Miód jest rozpoznawany na całym świecie ze względu na wysoką wartość odżywczą. Tradycyjnie był stosowany przez Egipcjan, Greków, Rzymian czy Chińczyków w leczeniu ran i chorobach jelit, w tym wrzodach żołądka. Stosowany jako lek na kaszel, ból gardła a także uszu. W Indiach miód lotosowy był tradycyjnie stosowany między innymi w leczeniu infekcji oczu. Oprócz stosowania zewnętrznego wykorzystywany był także wewnętrznie jako żywność funkcjonalna, dostarczająca energii i pożywienia w celu wzmocnienia organizmu. Dzięki wielu korzystnym właściwościom miód jest produktem drogim i staje się celem zafalszowań. Dlatego też niezwykle ważnym aspektem jest opracowanie metod analitycznych pozwalających na dokładne i precyzyjne różnicowanie pochodzenia miodu [1].

Zainteresowanie pszczołami sięga najdawniejszych czasów, aż 9000 lat daje się ściennym malowidłom z czasów paleolitu znajdującym się w jaskini d'Arana w Hiszpanii. Dzieło to przedstawia pszczele gniazdo, do którego sięga człowiek. Taka metoda zbierania miodu stosowana jest także w dzisiejszych czasach – w Neapolu jako atrakcja turystyczna pszczelarzy amatorów [2]. Naczynia z miodem odnaleziono w grobowcach faraonów, niegdyś symbolizowały one dobrobyt i władzę [3]. Miód używany był do balsamowania zwłok. Smarowanie zmarłego ciała miodem przez Babilończyków symbolizowało wieczne szczęście. Przez starożytnych Greków miód uważany był za nektar bogów oraz eliksir życia, zaś w Egipcie Ramzes II ustanowił część wynagrodzenia za pracę urzędnikom w miodzie. Królowa hellenistycznego Egiptu – Kleopatra – dla pielęgnacji swojego ciała zażywała kąpeli w mleku i miodzie [4]. Podczas wypraw Aleksander Wielki nakazywał mieszać miód z sokami owoców, winem i śniegiem dla orzeźwienia. Jego ranni żołnierze leczeni byli miodem, a zwłoki poległych konserwowano czystym miodem, po czym przewożono do Egiptu z Babilonii. W późniejszym czasie Neron dla poprawy nastroju swoich żołnierzy kazał tworzyć lody z lodowcowego, malin, miodu i imbiru [5]. Znaczenie miodu opisane jest w wielu znanych utworach, między innymi Iliadzie i Odysei Homera, w tekstach filozoficznych Platona, Arystotelesa i innych. Opis terapii z zastosowaniem miodu odnaleźć można w „Papiirus Ebersa”. W medycynie ajurwedyjskiej stosowano miód przez około 4000 lat, a o użyciu miodu do gojenia ran pisano na sumeryjskiej glinianej tabliczce. Starożytni lekarze, jak Arystoteles, Arystoksenos, Hipokrates, Cornelius Celsus, Galen, Porfir, nadali miodowi lecznicze właściwości. Wyznania i kultury, między innymi chrześcijaństwo, hinduizm czy też islam opisują w swoich księgach odżywcze i lecznicze właściwości miodu. W Biblii słowo „miód” pojawia się

¹ liliana.woszczak@urk.edu.pl, Wydział Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie.

² karen.khachatryan@urk.edu.pl, Wydział Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie.

aż 61 razy w różnych księgach. W islamie ma on szczególne znaczenie, ponieważ sam Mahomet zalecał go w leczeniu, zaś Koran opisuje miód jako produkt spożywczy i leczniczy [6]. W Afryce znaczna część pszczelarstwa wiąże się z wykorzystaniem tradycyjnych uli, które często wieszane są na gałęziach drzew lasów naturalnych, powstałych bez ingerencji człowieka, charakteryzujących się dużą ilością martwego drewna oraz drzew weteranów z nadrzewnymi mikrosiedliskami [7]. Pszczelarstwo w wielu krajach afrykańskich uprawiane jest metodami tradycyjnymi, czyli bez wpływu człowieka na dobór ras, co stanowi integralną część dziedzictwa kulturowego. Poza zastosowaniami leczniczymi i ekonomicznymi miód wiąże się z pewnymi wieloletnimi tradycjami w kulturze wielu krajów afrykańskich [8].

Miód to złożona mieszanka skoncentrowanego roztworu cukru, którego głównymi składnikami są fruktoza i glukoza. Dokładny stosunek fruktozy do glukozy w miodzie zależy w dużej mierze od źródła nektaru [9]. Ponadto miód zawiera disacharydy, takie jak sacharoza oraz tri- i wyższe oligosacharydy w niższych stężeniach [10]. Odnaleziono 16 typów oligosacharydów, w tym 11 disacharydów: turanoza, sacharoza, maltoza, izomaltoza, kajibioza, celobioza, palatynoza, gentiobioza, laminaribioza, neotrehaloza i nigerioza, a także 5 trisacharydów. Występują także tetrasacharydy: izomaltotetraoza, maltotetraoza, stachioza, nystoza i inne [11].

Poza cukrem w znacznie mniejszej ilości odnaleźć można w miodzie aminokwasy, białka, kwasy organiczne, witaminy, minerały, substancje lotne i polifenole. Białka obecne w miodzie to głównie enzymy (diastaza, amylaza, inwertaza, sacharaza i inne) ale występują również wolne aminokwasy. Kwasy organiczne obejmują: glukonowy, asparaginowy, masłowy, cytrynowy, octowy, mrówkowy, fumarowy, galakturonowy, glukonowy, glutaminowy, glutarowy, szikimowy, bursztynowy i wiele innych. Witaminy, jakie można odnaleźć, to tiamina, ryboflawina, kwas nikotynowy, kwas pantotenowy, pirydoksyna, biotyna lub kwas foliowy oraz witamina C. Zawartość minerałów mieści się w przedziale od 0,04% do 0,2%, spośród których najwięcej jest potasu, poza nim obecny jest także magnez, wapń, żelazo, fosfor, sód, mangan, cynk, lit, kobalt, jod, nikiel, bar, chrom, kadm, selen, srebro, arsen oraz miedź. Polifenole w miodzie mogą zawierać kwasy fenolowe (kawowy, waniliowy, syringowy, ferulowy, p-kumarowy, 3-hydroksybenzoesowy, elagowy itp.) i flawonoidy (kwarcetyna, kemferol, mirycetyna, pinocembryna, galangina i inne). Fenole obecne w miodzie mogą służyć do identyfikacji pochodzenia kwiatowego oraz jego pochodzenia geograficznego [12].

Miody wykorzystywane w niniejszej pracy to: miód nawłociowy, miód Manuka oraz miód gryczany.

Rodzaj nawłóć obejmuje ponad 100 gatunków kwiatów pochodzenia północno-amerykańskiego i kilkanaście gatunków znajdujących się w Ameryce Południowej, Europie i Azji. Wszystkie gatunki są zielone i trudne do rozróżnienia od siebie. Większość gatunków kwitnie późnym latem do jesieni. Powszechnie występuje na obrzeżach lasów, drogach pobocznych i łąkach [13]. W Polsce nawłóć rośnie na terenie całego kraju, jednak głównie na nizinach, w niskich górach, na polanach leśnych, miedzach i poboczach dróg. Uważana jest za roślinę rodzimą na tych terenach, kwitnie od połowy maja do października [14]. Miód nawłociowy posiada właściwości lecznicze dzięki kwiatom, z których jest pozyskiwany. Zawiera flawonoidy, garbniki i kwasy organiczne. Jest bogaty w witaminy i substancje bakteriobójcze. Ten rodzaj miodu ma charakterystyczny cytrynowy, kwaśny posmak i przyjemny aromat [15].

Miód Manuka jest odmianą pochodzącą z Nowej Zelandii, produkowany z nektaru krzewu *Leptospermum scoparium*. Zawiera metyloglioksal, który nadaje mu silne właściwości przeciwbakteryjne dla szerokiej gamy bakterii, w tym bakterii antybiotykoopornych. Posiada także ponad 200 substancji, w tym od 80% do 85% węglowodanów, od 15% do 17% wody, od 0,15 do 0,4% białka, 0,2% popiołu oraz enzymów, witamin i kwasów organicznych; pH mieści się w przedziale od 3,2 do 4,5, co także powoduje środowisko niesprzyjające rozwojowi bakterii [16]. Poza właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi wiele badań wykazało jego potencjał do zwiększenia wrażliwości bakterii i wirusów na popularne leki przeciwnieinfekcyjne [17]. Dzięki swoim właściwościom miód ten został uznany za środek przeciwdrobnoustrojowy, przeciwzapalny, przeciwtłeniający, a także odgrywa potężną rolę w gojeniu się ran. Odnotowano również jego właściwości przeciwnowotworowe, choć jego działanie antyproliferacyjne i apoptyczne na ludzkich komórkach raka wątroby pozostaje niejasne [18].

Miód gryczany pochodzi z kwiatów gryki, charakteryzuje się ciemnobrązową barwą oraz silnym aromatem. Spośród wszystkich miodów jest on najbogatszym źródłem przeciwutleniaczy [19].

Gryka jest pseudozbożem z rodziny *Polygonaceae*, ze względu na swoją wielozadaniowość – uznawana za produkt funkcjonalny. Gryka zwyczajna jest niezawodną, wysokowydajną rośliną miododajną dzięki dużej ilości kwiatów o długim czasie kwitnienia [20].

Skład miodu gryczanego to: fruktoza 51,6%, glukoza 46,59% oraz sacharoza 0,27%. Ponadto zawiera fosfor, magnez, cynk, żelazo, miedź, jod, nikiel, bor i kobalt należące do makro- i mikroelementów, a także witaminy: C, PP, B₁ oraz B₂. Zawartość białka sięga do 0,3% [21].

Miód jest spożywanym na całym świecie wysokowartościowym produktem o wysokiej cenie rynkowej związanej z jego pochodzeniem. Na etykiecie należy podać jego pochodzenie geograficzne i botaniczne. Dlatego niezwykle ważnym aspektem jest opracowanie metod analitycznych pozwalających na dokładne i precyzyjne różnicowanie pochodzenia miodu. Za markery służące do odróżnienia pochodzenia geograficznego i botanicznego służą: właściwości fizykochemiczne, związki fenolowe czy też metale obecne w produkcie. Dane są generowane za pomocą przeróżnych technik, w tym chromatografii cieczowej połączonej ze spektroskopią mas (LC-MS), jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR). Do innych technik należą wielowymiarowe analizy danych obejmujących metody nie-nadzorowane, takie jak analiza głównych składowych (PCA), hierarchiczna analiza skupień (HCA), a także metody nadzorowane, do których należą dyskryminacyjna analiza cząstkowych najmniejszych kwadratów (PLS-DA) lub regresja cząstkowych najmniejszych kwadratów (PLSR). Do oznaczania właściwości fizykochemicznych wykorzystuje się pomiary: pH, przewodności elektrycznej, barwy oraz lepkości. Stosowane są także: spektroskopia oscylacyjna i fluorescencyjna, techniki izotopowe, NMR, pomiary immunologiczne i molekularne.

Melisopalinologia to nauka zajmująca się badaniem pyłku pod mikroskopem, pozwalająca na ujawnienie pochodzenia miodu. Jest metodą tradycyjną, obecnie wykorzystywaną jedynie do porównania wyników uzyskanych za pomocą nowoczesnych analiz instrumentalnych. Alternatywnym podejściem jest analiza sensoryczna miodów łączona z określonymi parametrami fizykochemicznymi. Unikalne właściwości organoleptyczne

pozwalają określić pochodzenie kwiatowe miodu. Metoda ta wymaga dobrze wyszkolonego personelu oraz statystycznej oceny wyników, a jej główną wadą jest brak standaryzacji.

Innymi metodami do analizy miodów są metody spektroskopowe. Ich ogromną zaletą jest szybkość wykonania analiz bez stosowania skomplikowanych protokołów przygotowania próbek. Dane spektralne dostarczają informacji o profilu chemicznym próbek. Spektroskopia IR może dostarczać danych na temat pochodzenia botanicznego i entomologicznego miodów z wykorzystaniem widm o bliskiej podczerwieni NIR oraz średniej MIR. Spektroskopia NMR w połączeniu z wielowymiarowymi narzędziami chemometrycznymi odnalazła zastosowanie w badaniach autentyczności miodów [22].

Metody spektroskopowe są powszechnie stosowanymi i skutecznymi metodami w ocenie jakości produktów żywnościowych. Metody te wyróżniają się dokładnością, szybkością wykonania analizy oraz przygotowania próbek. W ostatnich latach coraz większą uwagę zwraca się na spektroskopię fluorescencyjną w celu określenia składu czy pochodzenia produktów spożywczych. W literaturze naukowej jest bardzo mało informacji na temat zastosowania metod spektroskopowych do określenia jakości oraz pochodzenia miodów. Wstępne badania pokazały, że spektroskopia emisyjna oraz UV-VIS mogą być skuteczną alternatywą dla metod konwencjonalnych.

2. Cel pracy

Celem pracy było opracowanie szybkich i jednocześnie dokładnych metod identyfikacji miodów z wykorzystaniem metod spektroskopowych takich jak spektroskopia UV-VIS i spektroskopia emisyjna, a także wykrywania zafałszowań w miodach.

3. Materiał badawczy

Materiałem badawczym były 3 rodzaje miodów pochodzące od różnych producentów, powszechnie występujących na rynku. Analizie poddano 9 próbek miodów nawłociowych, 3 próbki miodu Manuka oraz 8 próbek miodów gryczanych. Do badań UV-VIS wykonano 10% rozcieńczenia próbek miodów wodą dejonizowaną.

4. Metodyka badań

4.1. Spektroskopia UV-VIS

Widma UV-VIS rejestrowano w zakresie od 200 nm do 800 nm przy użyciu spektrofotometru skaningowego Shimadzu 2101.

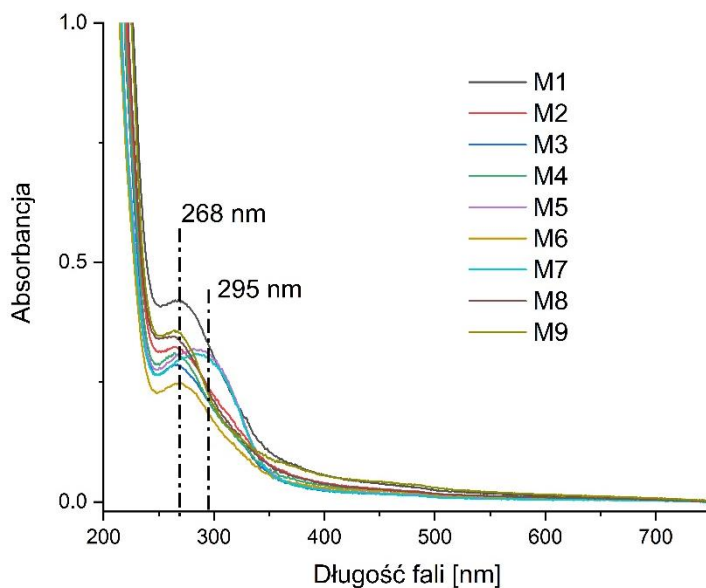
4.2. Spektroskopia emisyjna

Pomiaru emisji wszystkich próbek dokonano przy użyciu spektrofotometru F-7000 FL w zakresie długości fali od 290 nm do 650 nm przy długości fali wzbudzenia 270,0 nm.

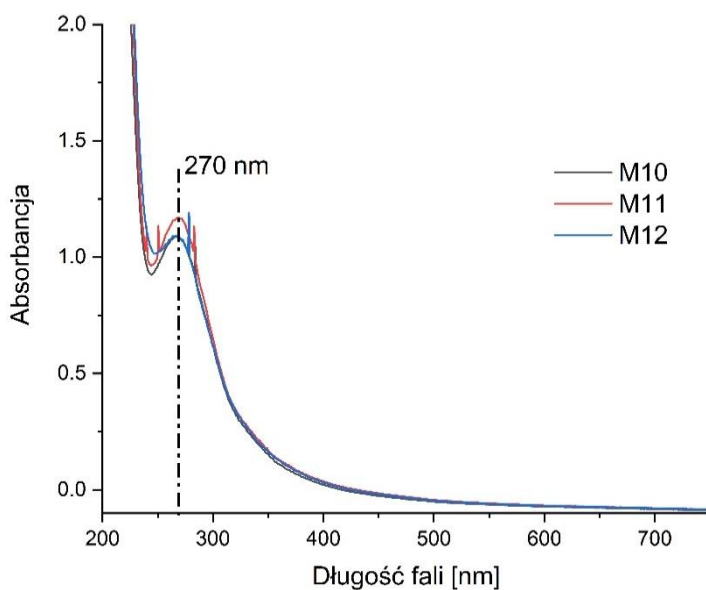
5. Wyniki i dyskusja

Badania widm UV-VIS ukazują różnice dla poszczególnych gatunków miodów. Pierwsza grupa miodów nawłociowych (rys. 1) wykazuje maksimum absorpcji przy 268 nm, kolejna grupa miodów to Manuka (rys. 2) – następuje różnica, widoczne przesunięcie pasma absorpcji (270 nm) z jednoczesnym wyraźnym wzrostem absorbancji. Ostatnia grupa badanych miodów to miody gryczane (rys. 3), dla których zaobserwowano maksimum absorpcji przy 280 nm.

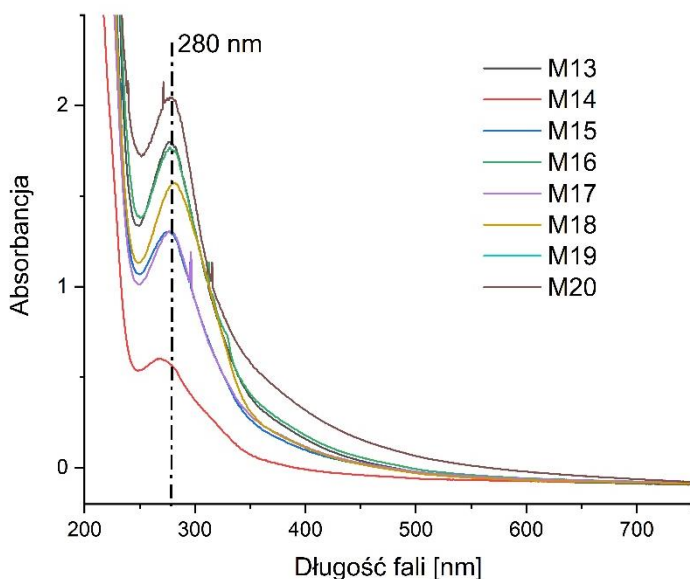
Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że nie da się jednoznacznie określić przynależności badanego miodu do danej grupy. Metody UV-VIS są stosowane częściej do oznaczeń ilościowych niż jakościowych [23, 24].



Rysunek 1. Widma UV-VIS dla miodów nawłociowych

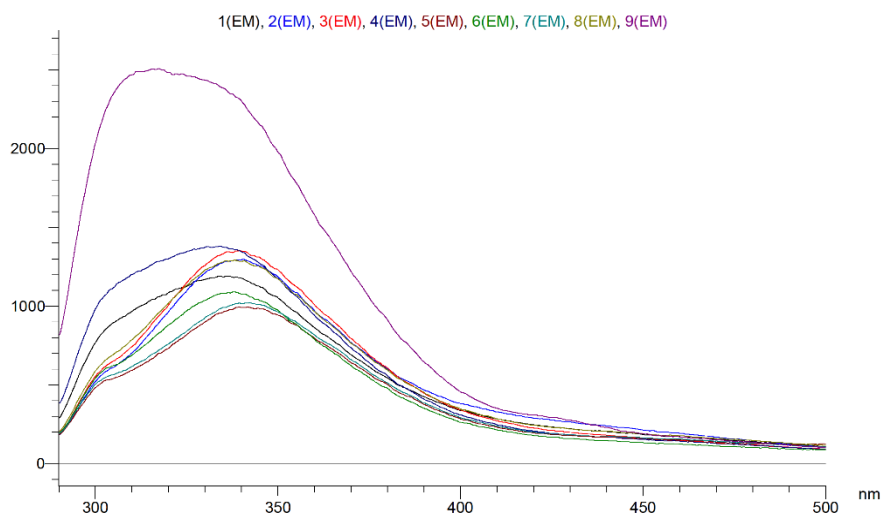


Rysunek 2. Widma UV-VIS dla miodów Manuka

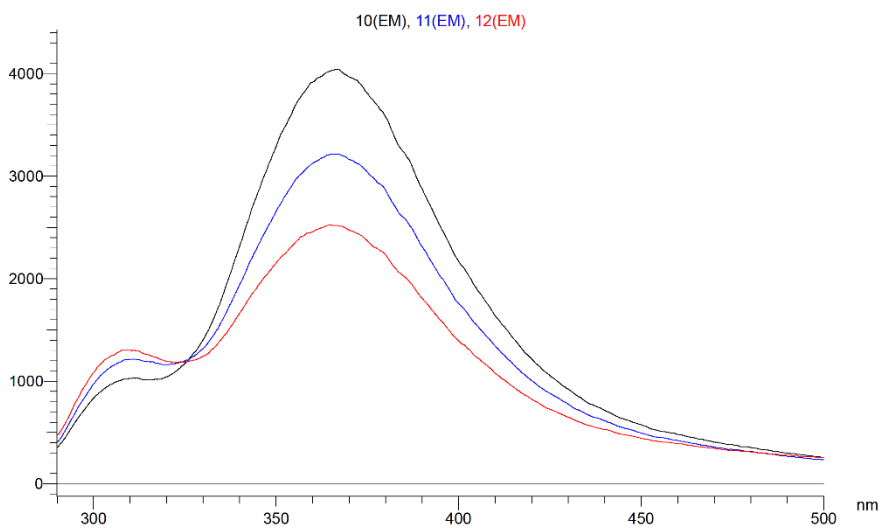


Rysunek 3. Widma UV-VIS dla miodów gryczanych

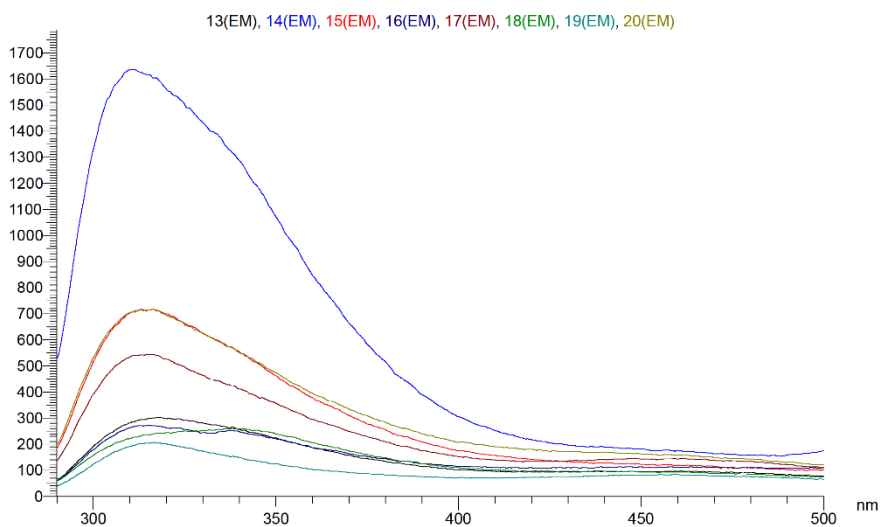
Na rysunkach 4, 5 i 6 przedstawiano widma emisyjne odpowiadające kolejno miodom nawłociowym, Manuka i gryczanym. Na podstawie widma emisyjnego można od razu zidentyfikować miody Manuka, których kształt wyraźnie różnił się od pozostałych gatunków miodu. Dla pozostałych (nawłociowych i gryczanych) kształty widm nie pozwalały na jednoznaczne wnioski. W tym celu opracowano algorytm umożliwiający grupowanie gatunków na podstawie widm. Wybrano najbardziej optymalne długości fal z odpowiadającymi wartościami intensywności emisji i zestawiono w tabeli 1. W następnej kolejności obliczono stosunek intensywności dla wybranych długości fal. Wyniki wyraźnie odzwierciedlają różnice pomiędzy danymi gatunkami miodów. Wyjątek stanowi miód z grupy gryczanych (M18), co może świadczyć o jego zafałszowaniu. Aby dokładnie określić powód różnicy w tej próbce, należałoby poddać ją dalszym badaniom. Wykorzystanie spektroskopii emisyjnej do identyfikacji miodów staje się obiecującym kierunkiem badań [25, 26].



Rysunek 4. Widma emisyjne dla miodów nawłociowych



Rysunek 5. Widma emisyjne dla miodów Manuka



Rysunek 6. Widma emisyjne dla miodów gryczanych

Tabela 1. Zestawienie intensywności emisji w wybranych długościach fal dla badanych miodów

Numer próbki miodu	A	B	A/B
	[310 nm]	[365 nm]	
1	964,7	782,5	1,233
2	702,6	874,8	0,803
3	743,6	1007	0,738
4	1282	940,4	1,363
5	593	795,5	0,745
6	688,7	788	0,874
7	616	817	0,754
8	786	965	0,815
9	2468	1578	1,564
10	1026	3939	0,260
11	1212	3126	0,388
12	1301	2458	0,529
13	282	187	1,508
14	1635	847	1,930
15	702	377	1,862

16	262	187	1,401
17	534	295	1,810
18	220	190	1,158
19	191	103	1,854
20	704	395	1,782

Źródło: [opracowanie własne].

6. Wnioski

Z powodzeniem udało się opracować metodę identyfikacji gatunku miodu na podstawie kształtu oraz obliczenia stosunków intensywności 2 wybranych pasm w widnie emisyjnym.

Ze względu na bardzo zbliżony skład chemiczny klasyczne metody analizy nie pozwalają na jednoznaczną identyfikację pochodzenia miodów. Porównując wyniki uzyskane ze spektroskopii UV-VIS oraz spektroskopii emisyjnej, można wnioskować, że widma emisyjne są bardziej wrażliwe (czułe) na różnice występujące pomiędzy różnymi gatunkami miodów. Dla wybranych 3 grup udało się obliczyć parametr (stosunek intensywności pasm przy długościach fal 310 nm i 365 nm), który pozwala kwalifikować produkt do określonej grupy. W tym najwyraźniej uwidacznia się to dla grupy miodów Manuka.

Uzyskane wyniki wskazują na to, że metoda pozwoli na opracowanie szybkiej i skutecznej analizy miodu oraz wykrywanie ewentualnych zafałszowań.

Badaniom poddano 20 próbek miodów, z czego 1 (M18) odbiegała od przyporządkowanej grupy, zaś dla pozostałych 19 próbek można było potwierdzić przynależność do danej grupy.

Literatura

1. Eteraf-Oskouei T., Najafi M., *Traditional and modern uses of natural honey in human diseases. A review*, Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 2017.
2. Ślósarz J. (oprac.), *Podręcznik dla pszczelarzy*, materiały szkoleniowe, 2020.
3. Kruszewski A.M., Naumowicz M., *Znaczenie pszczoły miodnej (Apis mellifera) i produktów pszczelich w życiu człowieka*, Edukacja Biologiczna i Środowiskowa, 4, 2017, s. 48-53.
4. Kadej M., Smolis A., *Historia pszczelarstwa, rodzaje produktów pszczelarskich*, Fundacja Ekologiczna „Zielona Akcja”, Legnica, 2015.
5. Hainbuch F., *Lecznicza moc pszczół. Najskuteczniejsze terapie od A do Z*, Vital Gwarancja Zdrowia, Białystok 2017, s. 11.
6. Israili Z.H., *Antimicrobial properties of honey*, American Journal of Therapeutics, 21(4), 2014, s. 304-323.
7. Wyka J., Piechnik Ł., Grzędzicka E., Lešo P., Dyderski M.K., Kajtoch Ł., *The vertical form of the common ivy Hedera helix L. is associated with diverse and semi-natural forests in Central European highlands*, Forest Ecology and Management, 530, 2023.
8. Requier F., Garnery L., Kohl P.L., Njovu H.K., Pirk C.W., Crewe R.M., Steffan-Dewenter I., *The conservation of native honey bees is crucial*, Trends in Ecology & Evolution, 34(9), 2019, s. 789-798.
9. Chin N.L., Sowndhararajan K., *A review on analytical methods for honey classification, identification and authentication*, [w:] *Honey analysis. New advances and challenges*, 2020.

10. Despland C., Walther B., Kast C., Campos V., Rey V., Stefanoni N., Tappy L., *A randomized-controlled clinical trial of high fructose diets from either Robinia honey or free fructose and glucose in healthy normal weight males*, Clinical Nutrition ESPEN, 19, 2017, s. 16-22.
11. Se K., Wahab R., Yaacob S., *Detection techniques for adulterants in honey. Challenges and recent trends*, Journal of Food Composition and Analysis, 2019, s. 16-32.
12. Miguel M.G., Antunes M.D., Faleiro M.L., *Honey as a complementary medicine*, Integrative Medicine Insights, 12, 2017.
13. Amtmann M., *The chemical relationship between the scent features of goldenrod (Solidago canadensis L.) flower and its unifloral honey*, Journal of Food Composition and Analysis, 23(1), 2010, s. 122-129.
14. Jasicka-Misiak I., Makowicz E., Stanek N., *Chromatographic fingerprint, antioxidant activity and colour characteristic of polish goldenrod (Solidago virgaurea L.) honey and flower*, European Food Research and Technology, 244, 2018, s. 1169-1184.
15. Dżugan M., Miłek M., Kielar P., Stępień K., Sidor E., Bocian A., *SDS-PAGE protein and HPTLC polyphenols profiling as a promising tool for authentication of goldenrod honey*, Foods, 11(16), 2022, s. 2390.
16. Schuhladen K., Mukoo P., Liverani L., Neščáková Z., Boccaccini A.R., *Manuka honey and bioactive glass impart methylcellulose foams with antibacterial effects for wound-healing applications*, Biomedical Materials, 15(6), 2020.
17. Hayes G., Wright N., Gardner S.L., Telzrow C.L., Wommack A.J., Vigueira P.A., *Manuka honey and methylglyoxal increase the sensitivity of Staphylococcus aureus to linezolid*, Letters in Applied Microbiology, 66(6), 2018, s. 491-495.
18. Al Refaey H.R., Sultan A.S., *Manuka honey induced apoptosis in hepatocellular carcinoma through inhibition of Wnt/b-catenin and ERK1/2*, Cancer Research, 78 (13 Supplement), 2018, s. 3553.
19. Dżugan M., Grabek-Lejko D., Swacha S., Tomczyk M., Bednarska S., Kapusta I., *Physicochemical quality parameters, antibacterial properties and cellular antioxidant activity of Polish buckwheat honey*, Food Bioscience, 34, 2020.
20. Nešović M., Nešović M., Gašić U., Tosti T., Horvacki N., Šikoparija B., Nedić N., Blagojević S., Ignjatović L., Tešić Ž., *Polyphenol profile of buckwheat honey, nectar and pollen*, Royal Society Open Science, 7(12), 2020.
21. Bąkowska M., Janda K., *Właściwości prozdrowotne wybranych miodów*, Pomeranian Journal of Life Sciences, 64(3), 2018, s. 147-151.
22. Tsagkaris A.S., Koulis G.A., Danezis G.P., Martakos I., Dasenakia M., Georgiou C.A., Thomaidis N.S., *Honey authenticity. Analytical techniques, state of the art and challenges*, RSC Advances, 11, 2021, s. 11273-11294.
23. Tsankova D., Lekova S., *UV-VIS spectroscopy and chemometrics analysis in distinguishing different types of Bulgarian honey*, materiał z konferencji: Knowledge and Control Systems Engineering (BdKCSE), 2019.
24. Jasińska B., Tomaka K., Uram-Dudek A., Paradowska K., *Fizykochemiczna analiza miodów z rejonu Podkarpacia*, Postępy Fitoterapii, 21(4), 2020, s. 219-227.
25. Xagoraris M., Revelou P.K., Alissandrakis E., Tarantilis P.A., Pappas C.S., *The use of right angle fluorescence spectroscopy to distinguish the botanical origin of greek common honey varieties*, Applied Sciences, 11(9), 2021, s. 4047.
26. Stanković M., Prokopijević M., Šikoparija B., Nedić N., Andrić F., Polović N., Radotić K., *Using front-face fluorescence spectroscopy and biochemical analysis of honey to assess a marker for the level of Varroa destructor infestation of honey bee (Apis mellifera) Colonies*, Foods, 12(3), 2023, s. 629.

Opracowywanie alternatywnych metod identyfikacji miodów

Streszczenie

Miód jest rozpoznawany na całym świecie ze względu na wysoką wartość odżywczą. Tradycyjnie był stosowany przez Egipcjan, Greków, Rzymian czy Chińczyków w leczeniu ran i chorobach jelit, w tym wrzodach żołądka, stosowany jako lek na kaszel, ból gardła, a także uszu. W Indiach miód lotosowy był tradycyjnie wykorzystywany między innymi w leczeniu infekcji oczu. Oprócz stosowania zewnętrznego użytkowany był także wewnętrznie – jako żywność funkcjonalna dostarczająca energii i pożywienia w celu wzmocnienia organizmu. Dzięki wielu korzystnym właściwościom miód jest produktem drogim i staje się celem zafałszowań. Dlatego też niezwykle ważnym aspektem jest opracowanie metod analitycznych pozwalających na dokładne i precyzyjne różnicowanie pochodzenia miodu.

Metody spektroskopowe są powszechnie stosowane i skuteczne w ocenie jakości produktów żywnościowych. Metody te wyróżniają się dokładnością, szybkością wykonania analizy oraz przygotowania próbek. W ostatnich latach coraz większą wagę zwraca się na spektroskopię fluorescencyjną w celu określenia składu czy pochodzenia produktów spożywczych. W literaturze naukowej jest bardzo mało informacji na temat zastosowania metod spektroskopowych do określenia jakości oraz pochodzenia miodów. Wstępne badania pokazały, że spektroskopia emisyjna oraz UV-VIS mogą być skuteczną alternatywą dla metod konwencjonalnych.

Celem pracy było opracowanie szybkich i jednocześnie dokładnych metod identyfikacji oraz wykrywania zafałszowań w miodach.

Słowa kluczowe: spektroskopia, zafałszowania, identyfikacja miodów

Development of alternative methods for identifying honeys

Abstract

Honey is recognized all over the world for its high nutritional value. Traditionally, it was used by Egyptians, Greeks, Romans or Chinese to heal wounds and intestinal diseases, including stomach ulcers. Used as a medicine for cough, sore throat and ears. In India, lotus honey has traditionally been used, among other things, to treat eye infections. In addition to external use, it was also used internally, as a functional food, providing energy and food to strengthen the body. Thanks to its many beneficial properties, honey is an expensive product and becomes the target of adulteration. Therefore, an extremely important aspect is the development of analytical methods allowing for accurate and precise differentiation of honey origin.

Spectroscopic methods are a commonly used and effective method in assessing the quality of food products. These methods are distinguished by accuracy, speed of analysis and sample preparation. In recent years, more and more attention has been paid to fluorescence spectroscopy in order to determine the composition or origin of food products. There is very little information in the scientific literature on the use of spectroscopic methods to determine the quality and origin of honey. Preliminary studies have shown that emission spectroscopy and UV-VIS can be an effective alternative to conventional methods.

The aim of the work was to develop fast and at the same time accurate methods for identifying and detecting adulteration in honey.

Keywords: spectroscopy, falsification, identifications of honeys

Immunohistochemiczna ocena ekspresji wybranych enzymów antyoksydacyjnych w jądrze szczurów szczepu Wistar otrzymujących ołów i cynk

1. Wstęp

Wytworzone przez jądro plemniki nie są w pełni dojrzałymi gametami, a zdolność do zapłodnienia komórki jajowej zyskują dopiero po około 10-dniowym pasażu przez jądro [1, 2]. Narząd ten nie jest jedynie rezerwuarem plemników, ponieważ podczas procesu jądrzowego dojrzewania męskie komórki rozrodcze ulegają zmianom funkcjonalnym, co sprawia, że prawidłowe funkcjonowanie jądra jest niezbędnym elementem męskiej płodności [1, 2].

1.1. Budowa jądra

Na podstawie badań morfologicznych i histologicznych jądro podzielono na głowę, trzon i ogon. Ściśle połączona z jądrem głowa jądra stanowi najgrubszą jego część, przechodzi ona w trzon jądra, leżący na tylnym brzegu jądra [1, 2], którego przedłużeniem jest ogon jądra [2].

1.2. Reaktywne formy tlenu a układ rozrodczy

Zaburzenie równowagi między produkcją reaktywnych form tlenu (RFT) a ich eliminacją w procesach antyoksydacyjnych (na korzyść stanu prooksydacyjnego) nosi nazwę stresu oksydacyjnego [3-5].

Potencjalnymi źródłami RFT w nasieniu są same plemniki oraz występujące w nim, głównie w stanach patologicznych, leukocyty [6, 7]. RFT charakteryzują się dualnością – w małych stężeniach odgrywają ważną, pozytywną rolę w fizjologii plemnika [2, 6, 7]. W zbyt wysokim stężeniu prowadzą natomiast do stresu oksydacyjnego, który może uszkadzać DNA plemników oraz utleniać białka błonowe, konsekwencją czego może być zmiana morfologii plemników, spadek ich ruchliwości i przeżywalności, co znacząco wpływa na potencjał zapładniający [6, 8, 9].

Jądro zapewnia optymalne warunki dla dojrzewania i magazynowania plemników, m.in. poprzez ich ochronę przed atakiem oksydacyjnym, za sprawą miejscowego działania przeciwutleniaczy [2, 10]. Eliminacja reaktywnych form tlenu odbywa się na drodze enzymatycznej i nieenzymatycznej [3-5, 8, 10, 11]. System nieenzymatyczny stanowią substancje niskocząsteczkowe, takie jak: kwas askorbinowy (witamina C), α -tokoferol (witamina E), β -karoten (witamina i prowitamina A), a także glutation w stanie zredukowanym (GSH) [3-5, 11]. Enzymatyczną ochronę antyoksydacyjną zapewniają m.in. enzymy: dysmutaza nadkwasowa, katalaza, peroksydaza glutationowa oraz reduktaza glutationowa [4, 6, 7, 9-12].

¹ joanna01525@gmail.com, Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Wydział Medycyny i Stomatologii, Pomorski Uniwersytet Medyczny.

² irena.baranowska.bosiacka@pum.edu.pl, Katedra Biochemii i Chemii Medycznej, Wydział Medycyny i Stomatologii, Pomorski Uniwersytet Medyczny.

³ agnieszka.kolasa@pum.edu.pl, Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Wydział Medycyny i Stomatologii, Pomorski Uniwersytet Medyczny.

1.3. Enzymy o działaniu antyoksydacyjnym

1.3.1. Dysmutaza ponadtlenkowa

Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD, ang. *superoxide dismutase*) katalizuje dysmutację anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$) do nadtlenu wodoru (H_2O_2) i tlenu (O_2) [3-6, 11, 12]. Dysmutaza ponadtlenkowa wraz z katalazą i peroksydazą glutationową tworzą zintegrowany system antyoksydacyjny zwany triadą antyoksydacyjną [3, 7, 12,]. Dysmutaza ponadtlenkowa występuje w 3 izoformach, kodowanych przez odmienne geny. Wyróżnia się: SOD-1 – homodimer, w którego centrum aktywnym występuje miedź i cynk, SOD-2 – tetramer, w którego centrum aktywnym zlokalizowany jest mangan, a także SOD-3 – tetramer zawierający w swojej cząsteczce atomy miedzi i cynku [12].

1.3.2. Katalaza

Katalaza (CAT, ang. *catalase*) to enzym odpowiedzialny za rozkład nadtlenu wodoru do wody i tlenu cząsteczkowego [3, 4, 8, 11, 12].

1.3.3. Peroksydaza glutationowa

Peroksydaza glutationowa (GPX, ang. *glutathione peroxidase*) jest enzymem uczestniczącym w redukcji H_2O_2 , czemu towarzyszy utlenienie zredukowanego glutationu [8, 11, 13]. Wykazano kilka izoenzymów GPX. GPX-5 jest sekrecyjną formą enzymu specyficzną tylko i wyłącznie dla najądra [7, 8, 13]. W najądrzu ulegają ekspresji także GPX-1, GPX-3 i GPX-4 [7, 8, 13].

1.3.4. Reduktaza glutationowa

Reduktaza glutationowa (GR, ang. *glutathione reductase*) jest nierozzerwalnie związana z aktywnością peroksydazy glutationowej. Enzym ten odtwarza zredukowaną formę glutationu jako źródło elektronów, wykorzystując NADPH [3, 4, 6, 8, 11].

1.4. Wpływ ołowiu i cynku na organizm człowieka

Ołów (ang. *lead*) jest szeroko rozpowszechnionym w przyrodzie metalem ciężkim [14, 15]. Pomimo wysokiej toksyczności – wciąż znajduje zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu. Do tej pory nie wykazano jakiegokolwiek pozytywnego wpływu ołowiu na organizm człowieka, ponadto nie istnieje poziom progowy szkodliwego działania ołowiu – jest on toksyczny w każdym stężeniu [8, 15].

Cynk (ang. *zinc*) jest mikroelementem niezbędnym do prawidłowego wzrostu i rozwoju ssaków. Warunkuje on prawidłowe funkcjonowanie układu odpornościowego, oddechowego i rozrodczego. Uczestniczy w eliminacji RFT, a także znosi toksyczne działanie ołowiu na organizm człowieka [16, 17].

Wiele badań dowodzi antagonistycznego charakteru relacji pomiędzy cynkiem i ołowiem [18-24]. Pierwiastki te współzawodniczą ze sobą w procesie wchłaniania jelitowego [18-24]. Metale te konkurują także podczas transportu do komórek (który odbywa się przy udziale metalotionein) oraz podczas ich wydalania [25].

2. Cel pracy

Ze względu na relatywnie długą obecność plemników w najądrzu – mogą one ulegać oddziaływaniu wielu substancji toksycznych [8, 13]. Badania prowadzone w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii PUM wykazały, że indukowane ołowiem zmiany

morfologiczne komórek nabłonkowych najądrza oraz stres oksydacyjny wpływają na ilość i stan obecnych tam plemników [8, 13, 15, 26-28]. Cynk natomiast uczestniczy w eliminacji reaktywnych form tlenu, a także znosi toksyczne działanie ołowiu na organizm człowieka [16, 17, 25].

W pracy tej wykorzystana została postnatalna ekspozycja szczurów szczepu Wistar na ołów, cynk i ołów plus cynk celem oceny zmiany ekspresji enzymów antyoksydacyjnych najądrza. Oceny tej dokonano metodą immunohistochemiczną z zastosowaniem pierwszorzędowych przeciwciał swoistych dla badanych enzymów (SOD-1, CAT, GPX5, GR). Celem niniejszej pracy było ustalenie, czy w odniesieniu do warunków kontrolnych przewlekła, postnatalna intoksykacja ołowiem wpływa na poziom badanych enzymów o działaniu antyoksydacyjnym oraz czy cynk znosi wpływ ołowiu na ekspresję poszczególnych enzymów antyoksydacyjnych najądrza.

3. Materiały i metody

Badania przeprowadzone zostały na materiale archiwalnym, tj. tkankach zatopionych w bloczkach parafinowych. Doświadczenie prowadzone było na modelu zwierzęcym zgodnie z uchwałą nr 32/2012 Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach.

Zdrowe samce szczurów szczepu Wistar pochodziły z hodowli Instytutu Medycyny Pracy w Łodzi. W trakcie doświadczenia zwierzęta przebywały w zwierzętarni Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w temperaturze pokojowej, w 12-godzinny cykl dobowym (D/N : 12h/12h). Szczury miały swobodny dostęp do paszy Murigran (Wytwórnia Koncentratów i Mieszanek Paszowych „Agropol”) i wody *ad libitum*.

Samce 6-8-tygodniowe podzielone zostały w sposób losowy na 4 grupy doświadczalne wg schematu przedstawionego w tabeli 1.

Tabela 1. Model doświadczalny

Grupa	Suplementacja
Kontrola	woda do picia <i>ad libitum</i>
Pb	0,1% octan ołowiu (CH_3COO) ₂ Pb w wodzie do picia <i>ad libitum</i>
Zn	300 mg ZnCO_3 /kg diety
Pb + Zn	0,1% octan ołowiu (CH_3COO) ₂ Pb w wodzie do picia <i>ad libitum</i> oraz 300 mg ZnCO_3 /kg diety

Źródło: opracowanie własne.

Po 4 tygodniach eksperymentu zwierzęta poddano narkozie pentobarbitem sodu zaaplikowanym dootrzewnowo w dawce 200 mg/kg masy ciała w celu pobrania tkanek, w tym najądrzy.

3.1. Wykonanie preparatów histologicznych i przygotowanie do reakcji immunohistochemicznej

Od 5 uśpionych szczurów z każdej opisanej powyżej grupy wypreparowano najądrza, które utrwalono w płynie Bouin’a, po czym zatopiono je w parafinie. Przy użyciu mikrotomu rotacyjnego (MICROM HM 340E, Thermo Fisher Scientific, Walldorf, Niemcy) wykonano skrawki seryjne o grubości 3-5 μm . Następnie preparaty zostały poddane odparafinowaniu i nawodnieniu.

3.2. Reakcja immunohistochemiczna

W celu oceny ekspresji enzymów antyoksydacyjnych wykonana została reakcja immunohistochemiczna (IHC). Odparafinowane skrawki były gotowane w buforze cytrynianowym o pH = 6,0 w kuchence mikrofalowej (2 × 5 min; 750 W) w celu odsłonięcia determinant antygenowych i ułatwienia przenikania przeciwciała. Wystudzone preparaty przepłukano 3-krotnie buforem PBS (ang. *phosphate-buffered saline*) o pH = 7,4. Kolejnym etapem było nałożenie na tkanki przeciwciał pierwszorzędowych przeciwko:

- dysmutazie ponadtlenkowej – poliklonalne królicze anty-SOD-1 (FL-154; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, nr katalogowy: sc-11407), stężenie końcowe 1 : 300;
- katalazie – poliklonalne królicze anty-CAT (H-300; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, nr katalogowy: sc-50508), stężenie końcowe 1 : 300;
- peroksydazie glutationowej – monoklonalne mysie anty-GPX-5 (D-2; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, nr katalogowy: sc-376877), stężenie końcowe 1 : 300;
- reduktazie glutationu – monoklonalne mysie anty-GR (A-5; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, nr katalogowy: sc-133136), stężenie końcowe 1 : 300.

Preparaty inkubowano z ww. przeciwciałami w komorze wilgotnej w 4°C przez 24 h. Następnego dnia preparaty doprowadzone do temp. pokojowej 2-krotnie (po 5 min) przepłukano buforem PBS. Do wizualizacji miejsca przyłączenia się przeciwciała do antygenu wykorzystano zestaw Dako LSAB + System-HRP (DakoCytomation, Glostrup, Denmark, nr katalogowy: K0679) opierający się na reakcji awidyna-biotyna-peroksydaza chrzanowa z diaminobenzydyną (DAB) jako chromogen, według dołączonej ulotki producenta. Przepłukane wodą preparaty podbarwiono hematoksyliną.

Kontrolę negatywną wykonano z pominięciem etapu inkubacji z przeciwciałami pierwszorzędowymi. Pozytywny efekt reakcji immunohistochemicznej obserwowano w mikroskopie świetlnym Leica DM5000B (Leica, Wetzlar, Germany) i identyfikowano jako obszar w komórce/tkance o brązowym kolorze. W związku z tym natężenie brązowego zabarwienia stanowi ogólną informację o immunoekspresji i immunolokalizacji badanych białek w tkance.

Opis słowny poziomu ekspresji enzymów wyrażony został w 6-stopniowej skali: (+++++) – bardzo intensywna reakcja, (++++) – intensywna reakcja, (++) – umiarkowana reakcja, (+) – słaba reakcja, (+/-) – znikoma reakcja, (-) – brak reakcji.

4. Wyniki

4.1. Immunoekspresja i immunolokalizacja badanych enzymów w przewodzie głowy najądrza

W komórkach nabłonkowych głowy najądrza szczurów poszczególnych grup doświadczalnych (kontrola, Pb, Zn, Pb + Zn) wykazano obecność badanych enzymów, których nasilenie ekspresji przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Poziom immunohistochemicznej ekspresji badanych enzymów antyoksydacyjnych (SOD-1, CAT, GPX-5, GR) w komórkach nabłonkowych przewodu głowy najądrza

GŁOWA NAJĄDRZA	SOD-1	CAT	GPX-5	GR
Kontrola	++	++	+/-	+
Pb	+	+/-	++	++++
Zn	++++	+++	+/-	++
Pb + Zn	++	+/-	+	+++

(++++) – bardzo intensywna reakcja, (+++) – intensywna reakcja, (++) – umiarkowana reakcja, (+) – słaba reakcja, (+/-) – znikoma reakcja, (-) – brak reakcji

Źródło: opracowanie własne.

W próbkach głowy najądrza inkubowanych bez przeciwciał pierwszorzędowych, stanowiących kontrolę swoistości reakcji IHC, nie obserwowano barwnego produktu.

4.1.1. Dysmutaza ponadtlenkowa w głowie najądrza

W komórkach nabłonkowych głowy najądrza szczurów grupy kontrolnej ekspresja SOD-1 wykazywała umiarkowany poziom ekspresji i przebiegała w sposób dyfuzyjny przez całą cytoplazmę komórki z lekkim umocnieniem w apikalnej jej części (fot. 1 A; czerwone strzałki).

W komórkach nabłonka szczurów otrzymujących ołów obserwowano znikomą immunoekspresję tego enzymu i miała ona charakter dyfuzyjny (fot. 1 B), podobnie jak w kontroli, mocniej zaznaczony apikalnie (fot. 1 B; czerwone strzałki).

Natomiast w grupie suplementowanej cynkiem intensywność reakcji IHC była bardzo wysoka, dała silny immunopozytywny odczyn występujący w obrębie całej cytoplazmy, szczególnie intensywny w części przypodstawnej komórki (fot. 1 C; niebieskie strzałki).

W skrawkach histologicznych zwierząt otrzymujących ołów oraz cynk ekspresja SOD-1, podobnie jak w grupie kontrolnej, wystąpiła na umiarkowanym poziomie, dyfuzyjnie w całej cytoplazmie, lecz była mocniej zaznaczona okołojądrowo (fot. 1 D; zielona strzałka).

W każdej z grup doświadczalnych jądra komórkowe były immunonegatywne pod względem ekspresji SOD-1.

Obecne w przewodzie plemniki również wykazywały dodatni odczyn reakcji na obecność SOD-1 (fot. 1 A-D; czarne gwiazdki).

4.1.2. Katalaza w głowie najądrza

W komórkach nabłonkowych głowy najądrza szczurów kontrolnych odnotowano cytoplazmatyczną, umiarkowaną immunoekspresję CAT o charakterze dyfuzyjnym (fot. 1 E).

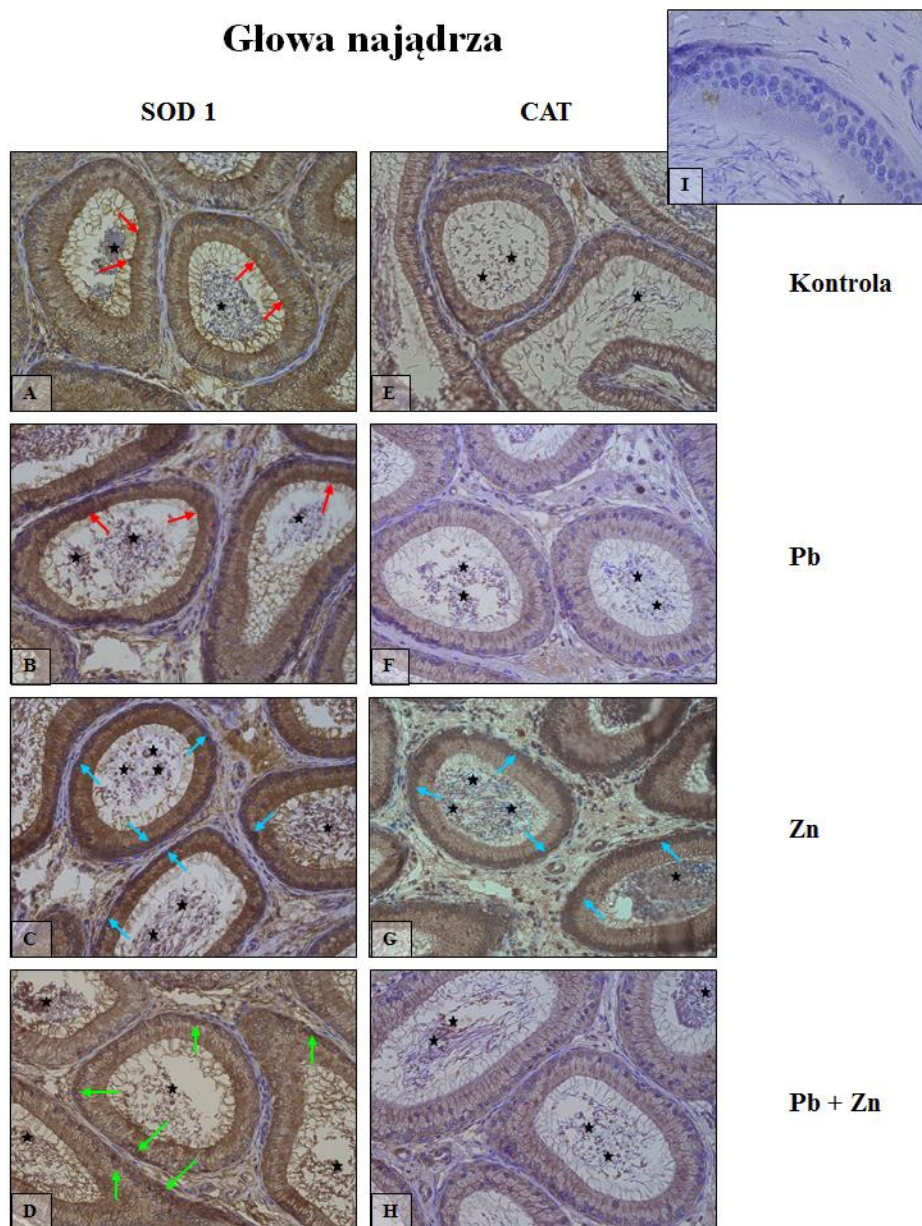
W grupie otrzymującej ołów wykazano niższą w odniesieniu do grupy kontrolnej, ale także dyfuzyjną, ekspresję katalazy (fot. 1 F).

Natomiast suplementacja cynkiem spowodowała uchwytyny wzrost immunoekspresji tego enzymu, szczególnie intensywnie był on zaznaczony w przypodstawnej części komórki (fot. 1 G; niebieskie strzałki).

W próbkach pobranych od szczurów otrzymujących zarówno Pb, jak i Zn obserwowano dyfuzyjną, znikomą reakcję IHC (fot. 1 H) o poziomie natężenia zbliżonym do poziomu natężenia ekspresji tego enzymu w grupie otrzymującej jedynie ołów (fot. 1 F).

W każdej z grup badanych jądra komórkowe były immunonegatywne pod względem ekspresji CAT.

Obecne w przewodzie głowy najądrza plemniki wykazywały dodatni odczyn reakcji na obecność katalazy (fot. 1 E-H; czarne gwiazdki).



Fotografia 1. Immunohistochemiczna ocena ekspresji dysmutazy ponadtlenkowej (SOD-1) (A–D) oraz katalazy (CAT) (E–H) w komórkach nabłonkowych głowy najądrza szczurów kontrolnych (A, E) intoksykowanych ołowiem (B, F), suplementowanych cynkiem (C, G) oraz intoksykowanych ołowiem w obecności cynku (D, H). Kontrola swoistości reakcji immunohistochemicznej (I)

Źródło: opracowanie własne.

4.1.3. Peroksydaza glutationowa w głowie najądrza

Ekspresję GPX5 obserwowano w apikalnej części komórek nabłonkowych głowy najądrza wszystkich badanych grup (fot. 2 A-D; czerwone strzałki), natomiast jądra komórkowe były immunonegatywne pod względem badanego enzymu. Wzór immunolokalizacji GPX5 był podobny we wszystkich grupach, różnił się jedynie poziomem ekspresji.

W komórkach nabłonkowych głowy najądrza szczurów grupy kontrolnej (fot. 2 A), jak i grupy suplementowanej cynkiem (fot. 2 C) poziom reakcji immunohistochemicznej był dość niski.

W komórkach nabłonkowych szczurów eksponowanych na ołów (fot. 2 B) ekspresja GPX5 była nieznacznie wyższa niż w grupie kontrolnej (fot. 2 A) i grupie otrzymującej cynk (fot. 2 C).

W grupie doświadczalnej eksponowanej na Pb i Zn immunoekspresja GPX5 wykazywała nasilenie (fot. 2 D) podobne do grupy ołowiowej (fot. 2 B).

Obecne w przewodzie głowy najądrza plemniki wykazywały dodatni odczyn reakcji na obecność sekrecyjnej formy peroksydazy glutationowej (fot. 1 A-D; czarne gwiazdki).

4.1.4. Reduktaza glutationu w głowie najądrza

W warunkach kontrolnych GR wykazuje znikomą ekspresję w komórkach nabłonkowych przewodu głowy najądrza, i raczej zlokalizowaną okołojądrowo (fot. 2 E; zielone strzałki).

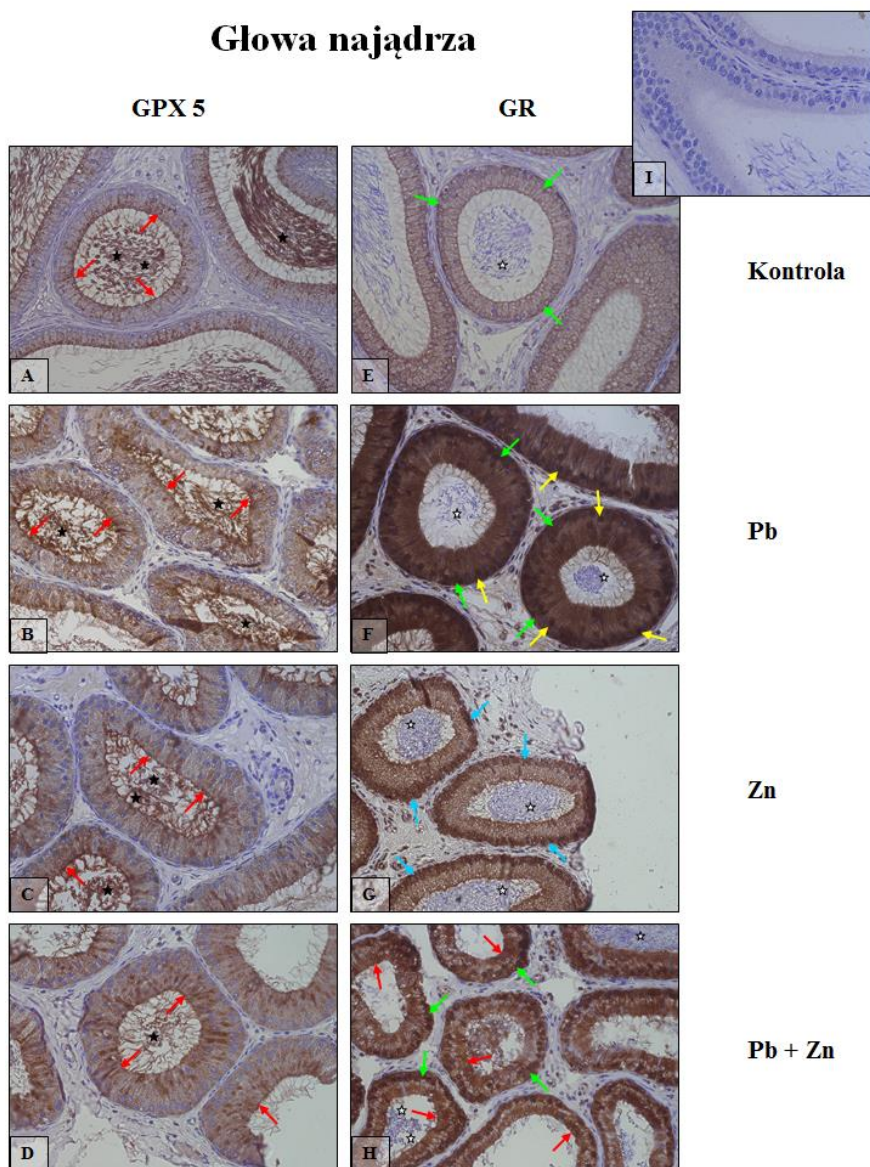
Ekspozycja na ołów spowodowała znaczny wzrost poziomu immunoekspresji GR o charakterze dyfuzyjnym, jak również z nasileniem w obrębie strefy okołojądrowej (fot. 2 F; zielone strzałki). W tej grupie badanej część jąder komórkowych wykazywała obecność reduktazy glutationu (fot. 2 F; żółte strzałki).

W najądrzowych komórkach nabłonkowych szczurów suplementowanych cynkiem intensywność reakcji IHC była umiarkowana, jednakże zdecydowanie intensywniejsza w części przypadkowej komórki (fot. 2 G; niebieskie strzałki).

W próbkach pobranych od zwierząt otrzymujących Pb + Zn odnotowano intensywną immunoekspresję GR o charakterze okołojądrowym (fot. 2 H; zielone strzałki) i adluminalnym (fot. 2 H; czerwone strzałki).

Obecne w przewodzie głowy najądrza plemniki nie wykazywały immunoekspresji reduktazy glutationu (fot. 2 E-H; białe gwiazdki).

Głowa jądra



Fotografia 2. Immunohistochemiczna ocena ekspresji peroksydazy glutationowej (GPX-5) (A–D) oraz reduktazy glutationu (GR) (E–H) w komórkach nabłonkowych głowy jądra szczurów kontrolnych (A, E) intoksykowanych ołowiem (B, F), suplementowanych cynkiem (C, G) oraz intoksykowanych ołowiem w obecności cynku (D, H). Kontrola swoistości reakcji immunohistochemicznej (I)
Źródło: opracowanie własne.

4.2. Immunoekspresja i immunolokalizacja badanych enzymów w przewodzie ogona jądra

W obrębie tych samych grup doświadczalnych kierunek zmian ekspresji enzymów antyoksydacyjnych w ogonie jądra przebiegał w sposób bardzo podobny do tych występujących w głowie jądra. Immunoekspresja w jądrzowych komórkach nabłonkowych przebiegała z natężeniem opisanym w tabeli 3.

Tabela 3. Poziom immunohistochemicznej ekspresji badanych enzymów antyoksydacyjnych (SOD-1, CAT, GPX-5, GR) w komórkach nabłonkowych przewodu ogona najądrza

OGON NAJĄDRZA	SOD-1	CAT	GPX-5	GR
Kontrola	++++	+	+/-	-
Pb	+	+/-	++	++++
Zn	+++	+	+/-	+
Pb + Zn	++	+/-	+	++

(++++)-bardzo intensywna reakcja, (+++)-intensywna reakcja, (++)-umiarkowana reakcja, (+)-słaba reakcja, (+/-)-znikoma reakcja, (-)-brak reakcji

Źródło: opracowanie własne.

W próbkach ogona najądrza inkubowanych bez przeciwciał pierwszorzędowych, stanowiących kontrolę swoistości reakcji immunohistochemicznej, nie obserwowano barwnego produktu.

4.2.1. Dysmutaza ponadtlenkowa w ogonie najądrza

W komórkach nabłonkowych ogona najądrza zwierząt kontrolnych obserwowano bardzo intensywny immunopozytywny odczyn, występujący w całej cytoplazmie, przesłaniający jądra komórek (fot. 3 A).

W tkankach pochodzących od szczurów otrzymujących ołów poziom immunоекспресji SOD-1 był niski i objawiał się w sposób dyfuzyjny przez całą cytoplazmę komórek nabłonkowych (fot. 3 B); jądra komórkowe były immunonegatywne.

W komórkach nabłonkowych ogona najądrza szczurów będących w grupie suplementowanej cynkiem ekspresja SOD-1 była także dyfuzyjna, ale wyższa (fot. 3 C) niż u zwierząt otrzymujących Pb (fot. 3 B), jednakże niższa w odniesieniu do ekspresji SOD-1 u zwierząt kontrolnych (fot. 3 A).

W komórkach nabłonkowych ogona najądrza pobranych od szczurów otrzymujących Pb + Zn odnotowano umiarkowaną immunоекспресję SOD-1 o charakterze dyfuzyjnym przez całą cytoplazmę (fot. 3 D); jądra komórkowe nie wykazywały ekspresji tego enzymu.

We wszystkich grupach badanych (kontrola, Pb, Zn, Pb+Zn), obecne w przewodzie najądrza plemniki były SOD1-pozytywne (fot. 3 A-D; czarne gwiazdki).

4.2.2. Katalaza w ogonie najądrza

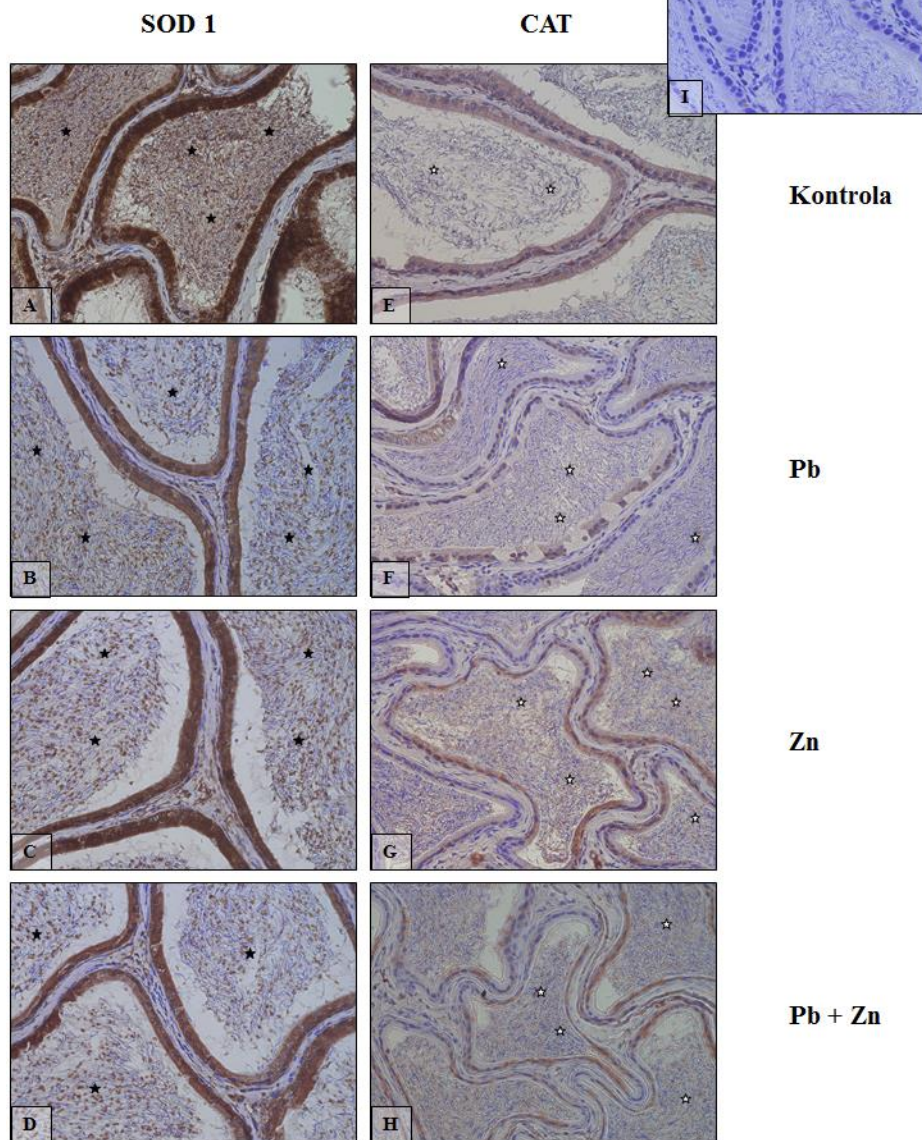
W komórkach ogona najądrza zwierząt grupy kontrolnej (fot. 3 E), jak i otrzymującej cynk (fot. 3 G) cytoplazmatyczna i dyfuzyjna ekspresja CAT była słaba.

W grupie szczurów eksponowanych na ołów (fot. 3 F) oraz ołów i cynk (fot. 3 H) reakcja IHC w komórkach nabłonkowych była znikoma i także miała charakter dyfuzyjny.

Jądra komórkowe we wszystkich grupach doświadczalnych były immunonegatywne pod względem obecności katalazy.

We wszystkich grupach badanych obecne w przewodzie ogona najądrza plemniki nie wykazywały obecności CAT (fot. 3 E-H; białe gwiazdki).

Ogon najądrza



Fotografia 3. Immunohistochemiczna ocena ekspresji dysmutazy ponadtlenkowej (SOD-1) (A–D) oraz katalazy (CAT) (E–H) w komórkach nabłonkowych ogona najądrza szczurów kontrolnych (A, E) intoksykowanych ołowiem (B, F), suplementowanych cynkiem (C, G) oraz intoksykowanych ołowiem w obecności cynku (D, H). Kontrola swoistości reakcji immunohistochemicznej (I)

Źródło: opracowanie własne.

4.2.3. Peroksydaza glutationowa w ogonie najądrza

W komórkach ogona najądrza szczurów kontrolnych wykazano znikomą dyfuzyjną ekspresję GPX5 oraz brak obecności tego enzymu w jądrach komórkowych (fot. 4 A).

W skrawkach pochodzących od zwierząt eksponowanych na ołów obserwowano umiarkowane natężenie immunoekspresji GPX5, występujące w całej cytoplazmie (fot. 4 B); jądra komórkowe były immunonegatywne.

Komórki nabłonkowe najądrzy szczurów suplementowanych cynkiem wyglądały na immunonegatywne bądź na bardzo słabo immunopozytywne (fot. 4 C).

W próbkach pochodzących od szczurów grupy otrzymującej Pb + Zn reakcja IHC była nieznacznie silniejsza (fot. 4 D) niż ta w grupie kontrolnej (fot. 4 A), jednak słabsza niż w grupie otrzymującej ołów (fot. 4 B). Jądra komórkowe były wyraźnie immunonegatywne pod względem ekspresji GPX5 (fot. 4 D).

Obecne w świetle przewodu ogona najądrza plemniki były GPX5-dodatnie tylko w grupach Pb, Zn, Pb + Zn (fot. 4 B-D; czarne gwiazdki).

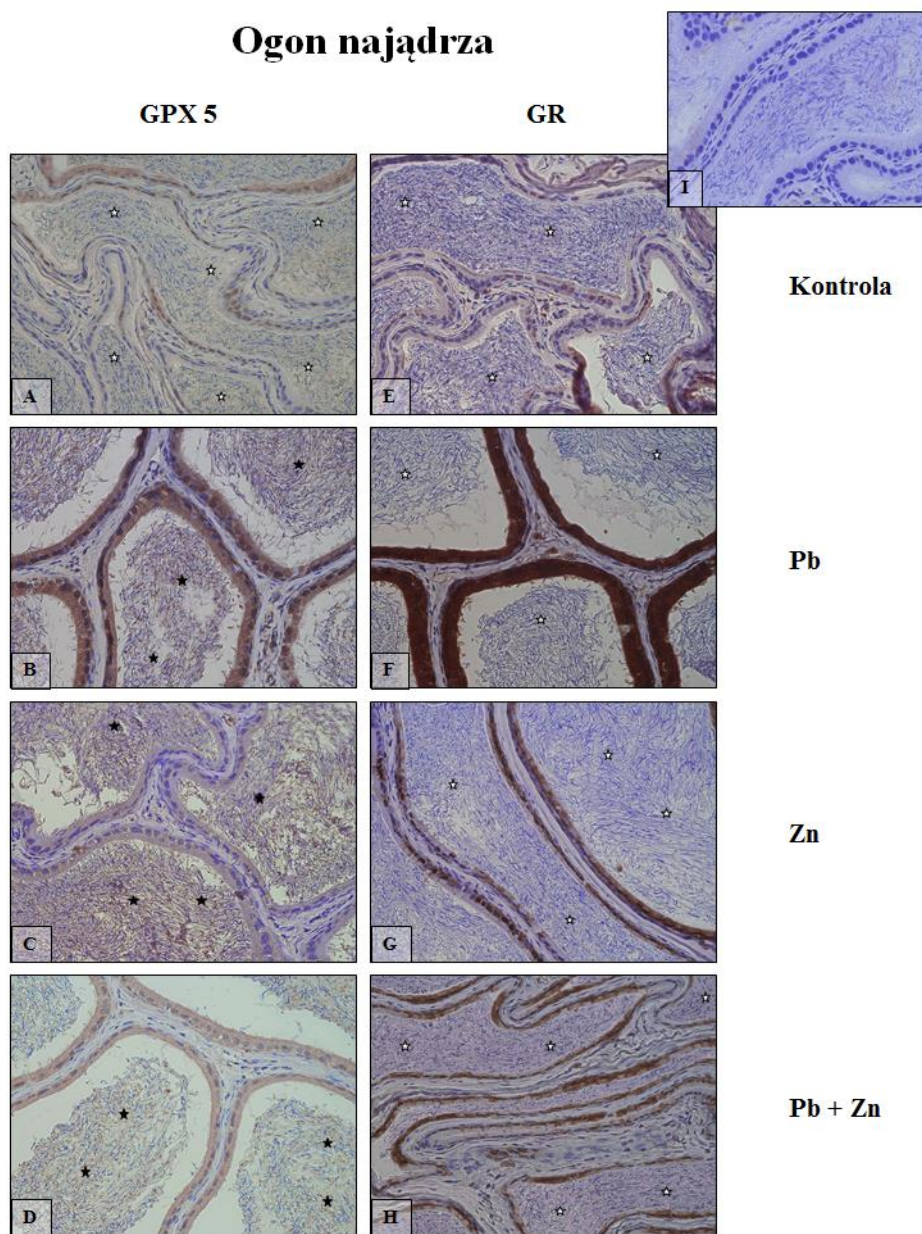
4.2.4. Reduktaza glutationu w ogonie najądrza

Reduktaza glutationu nie wykazywała ekspresji w większości komórek nabłonkowych ogona najądrza szczurów kontrolnych, nieliczne były słabo immunopozytywne (fot. 4 E).

Ekspozycja zwierząt na ołów spowodowała bardzo wyraźny wzrost immunoekspresji tego enzymu w komórkach nabłonkowych ogona (fot. 4 F), gdzie reakcja IHC w cytoplazmie była bardzo intensywna i przysłaniała jądra komórkowe.

W skrawkach pobranych od zwierząt suplementowanych cynkiem oraz otrzymujących ołów wraz z cynkiem komórki nabłonkowe wykazywały odpowiednio słabą (fot. 4 G) i umiarkowaną (fot. 4 H) ekspresję GR o charakterze dyfuzyjnym oraz brak ekspresji tego enzymu w jądrze komórkowym.

We wszystkich grupach badanych obecne w przewodzie plemniki nie wykazywały immunoekspresji GR (fot. 4 E-H; białe gwiazdki).



Fotografia 4. Immunohistochemiczna ocena ekspresji peroksydazy glutationowej (GPX-5) (A–D) oraz reduktazy glutationu (GR) (E–H) w komórkach nabłonkowych ogona najądra szczurów kontrolnych (A, E) intoksykowanych ołowiem (B, F), suplementowanych cynkiem (C, G) oraz intoksykowanych ołowiem w obecności cynku (D, H). Kontrola swoistości reakcji immunohistochemicznej (I)

Źródło: opracowanie własne.

5. Wnioski i dyskusja

Prowadzone w niniejszej pracy badania wykazały, że 4-tygodniowa ekspozycja szczurów szczepu Wistar na 0,1% octan ołowiu ($(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$) wpłynęła na aktywność wszystkich analizowanych enzymów (SOD-1, CAT, GPX-5, GR), ponadto w obrębie

tych samych grup doświadczalnych (Pb, Zn oraz Pb + Zn) kierunek zmian ekspresji enzymów antyoksydacyjnych w ogonie najądrza przebiegał w sposób dość analogiczny do tych występujących w głowie najądrza. W niniejszym badaniu intoksykacja ołowiem spowodowała uchwytyny spadek ekspresji SOD-1 i CAT w komórkach nabłonkowych przewodu głowy i ogona najądrza oraz wzrost ekspresji GPX-5 i GR również wzdłuż całego przewodu najądrza w odniesieniu do grupy kontrolnej. Uzyskane przez nas wyniki dotyczące SOD i CAT korelują z badaniami Batra i wsp. [29], którzy wykazali spadek aktywności SOD i CAT w jądrach szczurów po 3-miesięcznej intoksykacji ołowiem (50 mg $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb/kg}$ m.c.). Także ekspozycja samic szczurów na ołów w trakcie ciąży i laktacji spowodowała obniżenie aktywności SOD i CAT w jądrze i głowie najądrzy zwierząt potomnych [30]. Podobne wyniki uzyskali Apaydin i wsp. [31], którzy u szczurów eksponowanych na ołów zauważyli spadek aktywności SOD i CAT w najądrzu. Doświadczenie Marchlewicz [8] dotyczące ekspozycji szczurów na 1% roztwór octanu ołowiu wykazało spadek aktywności CAT w głowie (o 88%) i ogonie najądrza (o 46%) oraz wzrost aktywności GPX w głowie (o 58%) i ogonie najądrza (o 61%) w porównaniu do grupy kontrolnej, co jest zgodne z wynikami niniejszej pracy, uwzględniającej podział przewodu na części. Wykazany w tej pracy wzrost ekspresji GPX-5 i GR w najądrzu szczura narażonego na ołów jest prawdopodobnie spowodowany wyższym zapotrzebowaniem na te enzymy antyoksydacyjne, wynikającym z Pb-zależnego wzrostu stężenia H_2O_2 i nadtlenków lipidów. Wzrost aktywności peroksydazy glutationowej jest przypuszczalnie mechanizmem adaptacyjnym, obniżającym toksyczność ołowiu. Uzyskany w pracy wzrost immunoekspresji GPX-5 przy spadku CAT w komórkach nabłonkowych najądrza szczura intoksykowanego ołowiem był prawdopodobnie związany ze wzrostem H_2O_2 w tym narządzie. Oba te enzymy antyoksydacyjne wykazują różnice w stałej Michaelisa w stosunku do nadtlenku wodoru. Zakłada się, że przy niskim stężeniu H_2O_2 za jego redukcję odpowiedzialna jest peroksydaza, natomiast przy wysokim – katalaza [25]. Spadek ekspresji CAT i wzrost ekspresji GPX pozwala wnosić, że stężenie H_2O_2 po ekspozycji na ołów było na tyle wysokie, iż podstawowa wydajność GPX była zbyt niska (i musiała wzrosnąć), lecz zbyt niskie, by doprowadzić do wzrostu ekspresji CAT. Podobnie jak w niniejszej pracy, wzrost aktywności GR w odpowiedzi na ołów w swoich badaniach uzyskał także Howard [32], który wykazał, że u osób narażonych na ołów aktywność GR erytrocytów jest 51% wyższa, gdy poziom ołowiu we krwi jest w zakresie 41-70 $\mu\text{g/dL}$ i aż 94% wyższa, gdy poziom ołowiu we krwi jest wyższy niż 71 $\mu\text{g/dL}$, w porównaniu do grupy kontrolnej. Według autora wzrost aktywności reduktazy glutationu jest formą mechanizmu zapobiegającego redukcji grup sulfhydrylowych przez ołów. Przeprowadzone barwienie immunohistochemiczne wykazało, że cynk w wysokiej, lecz nietoksycznej dawce (300 mg ZnCO_3/kg diety) znosi wpływ ołowiu na ekspresję enzymów antyoksydacyjnych w komórkach nabłonkowych głowy i ogona najądrza szczura, prowadząc do wzrostu ekspresji SOD-1 i CAT oraz do spadku ekspresji GPX-5 i GR w porównaniu do grupy zwierząt intoksykowanych jedynie ołowiem.

W tej pracy w sposób szczególnie pochyłono się nad udziałem ołowiu w procesach wolnorodnikowych. Udowodniono, że postnatalna ekspozycja na ten metal ciężki powoduje zmianę ekspresji enzymatycznych elementów bariery antyoksydacyjnej. Od wielu lat badacze niemalże jednogłośnie wnioskuje, że stres oksydacyjny w narządach układu płciowego (jądro, najądrze), a także w samym nasieniu skutkuje obniżeniem potencjału zapładniającego plemników, a za pogarszanie się jakości nasienia [33] może odpowia-

dać m.in. zanieczyszczenie środowiska [34-36]. W niniejszej pracy odnotowano, że cynk znosi działanie ołowiu na ekspresję enzymów antyoksydacyjnych w najądrzu szczura. Proces ten nie jest jednak do końca poznany i zanim suplementacja antyoksydantami, takimi jest cynk, stanie się rutynowym postępowaniem terapeutycznym w niepłodności męskiej spowodowanej stresem oksydacyjnym konieczne są dalsze badania tego zagadnienia.

Literatura

1. Cichocki T., Litwin J.A., Mirecka J., *Kompendium histologii*, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 2002, s. 320-322.
2. Kolasa A., Marchlewicz M., Świder M., Sikorski A., Wenda-Różewicka L., Wiszniewska B., *Najądrze – budowa i funkcja*, [w:] Piasecka M. (red.), *Układ płciowy męski – badania kliniczne i doświadczalne*, Wydawnictwo Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego, Szczecin 2013, s. 419-428.
3. Bartosz G., *Druga twarz tlenu*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2013, s. 16-34, 88-119, 144-177.
4. Zabłocka A., Janusz M., *Dwa oblicza wolnych rodników tlenowych*, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 62, 2008, s. 118-124.
5. Ball S., *Antyoksydanty w medycynie i zdrowiu człowieka*, Oficyna Wydawnicza Medyk, Warszawa 2001, s. 9-27.
6. Frączek M., Kurpisz M., *System redoks w nasieniu męskim i peroksydacyjne uszkodzenia plemników*, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 59, 2005, s. 523-534.
7. Vernet P., Aitken R.J., Drevet J.R., *Antioxidant strategies in the epididymis*, Molecular and Cellular Endocrinology, 216, 2004, s. 31-39.
8. Marchlewicz M., *Protektoryjna funkcja najądrza wobec plemników*, rozprawa habilitacyjna, Pomorska Akademia Medyczna, Szczecin 2004, s. 14-40.
9. Łukaszewicz-Hussain A., *Rola glutationu i enzymów z nim związanych w procesach antyoksydacyjnych organizmu*, Medycyna Pracy, 54, 2003, s. 473-479.
10. Potts R.J., Jefferies T.M., Notarianni L.J., *Antioxidant capacity of the epididymis*, Human Reproduction, 14, 1999, s. 2513-2516.
11. Czajka A., *Wolne rodniki tlenowe a mechanizmy obronne organizmu*, Nowiny Lekarskie, 75, 2006, s. 582-586.
12. Skólmowska M., Kmiec M., *Enzymosomy antyoksydacyjne – właściwości i zastosowanie*, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 65, 2011, s. 640-644.
13. Kolasa A., *Najądrze w doświadczalnym modelu deficytu DHT*, maszynopis pracy doktorskiej, Pomorska Akademia Medyczna, Szczecin 2005, s. 7-16.
14. Krzywy I., Krzywy K., Pastuszek-Gabinowska M., Brodniewicz A., *Ołów- czy jest się czego obawiać?* Annales Academiae Medicae, 56, 2010, s. 118-128.
15. Marchlewicz M., Piasecka M., Baranowska-Bosiacka I., Kondarewicz A., Wenda-Różewicka L., Wiszniewska B., *Wpływ związków ołowiu na morfologię i funkcję gonady męskiej*, [w:] Piasecka M. (red.), *Układ płciowy męski – badania kliniczne i doświadczalne*, Wydawnictwo Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego, Szczecin 2013, s. 370-377.
16. Gapys B., Raszeja-Specht A., Bielarczyk H., *Rola cynku w procesach fizjologicznych i patologicznych organizmu*, Diagnostyka Laboratoryjna, 50, 2014, s. 45-52.
17. Puzanowska-Tarasiewicz H., Kuźmicka L., Tarasiewicz M., *Funkcje biologiczne wybranych pierwiastków. III. Cynk – składnik i aktywator enzymów*, Polski Merkuriusz Lekarski, 161, 2009, s. 419-422.
18. Abdulla M., Chmielnicka J., *New aspects on the distribution and metabolism of essential trace elements after dietary exposure to toxic metals*, Biological Trace Element Research, 23, 1990, s. 25-53.

19. Flora C.J., Kumar D., Gupta S., *Interaction of zinc, methionine or their combination with lead at gastrointestinal or post-absorptive level in rats*, Pharmacology and Toxicology, 69, 1991, s. 3-7.
20. Panemangalore M., Bebe F.N., *Effects of low oral lead and cadmium exposure and zinc status of heme metabolites in weanling rats*, International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health, 9, 1996, s. 141-151.
21. Cerklewski F.L., *Postabsorptive effect of increased dietary zinc on toxicity and removal of tissue lead in rats*, The Journal of Nutrition, 114, 1984, s. 550-554.
22. Petering H.G., *Some observations on the interaction of zinc, copper and iron metabolism in lead and cadmium toxicity*, Environmental Health Perspectives, 25, 1978, s. 141-145.
23. Goyer R.A., *Lead toxicity: current concerns*, Environmental Health Perspectives, 100, 1993, s. 177-187.
24. Kulikowska E., Moniuszko-Jakoniuk J., Miniuk K., *The effect of zinc on the toxic action of lead after administration of ethanol to rats*, Polish Journal of Pharmacology and Pharmacy, 41, 1989, s. 281-289.
25. Kulikowska-Karpińska E., *Wpływ cynku na procesy oksydacyjno-redukcyjne zachodzące w ustroju szczura narażonego na różne stężenia kadmu lub ołowiu*, rozprawa habilitacyjna, Akademia Medyczna, Białystok 2004, s. 16-44.
26. Marchlewicz M., *Efektywność barier krew-jądro i krew-najądrze dla ołowiu*, maszynopis pracy doktorskiej, Pomorska Akademia Medyczna, Szczecin 1993, s. 1-15.
27. Marchlewicz M., Piasecka M., Baranowska-Bosiacka I., Kolasa A., Wenda-Różewicka L., Wiszniewska B., *Wpływ związków ołowiu na morfologię i funkcję najądrza*, [w:] Piasecka M. (red.), *Układ płciowy męski – badania kliniczne i doświadczalne*, Wydawnictwo Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego, Szczecin 2013, s. 450-470.
28. Piasecka M., *Wpływ przewlekłego stosowania jonów ołowiatowych na plemniki szczura*, maszynopis pracy doktorskiej, Pomorska Akademia Medyczna, Szczecin 1992, s. 3-19.
29. Batra N., Nehru B., Bansal M.P., *The effect of zinc supplementation on the effects of lead on the rat testis*, Reproductive Toxicology, 12, 1998, s. 534-540.
30. Pillai P., Pandya C., Bhatt N., Gupta S.S., *Biochemical and reproductive effects of gestational/lactational exposure to lead and cadmium with respect to testicular steroidogenesis, antioxidant system, endogenous sex steroid and cauda-epididymal functions*, Andrologia, 44, 2012, s. 92-101.
31. Apaydin F., Bas H., Kalender Y., *Lead and cadmium induced oxidative stress in epididymis and spleen of rats. Effects of Sesamol*, Commagene Journal of Biology, 5, 2021, s. 7-11.
32. Howard J.K., *Interrelationships of glutathione reductase, 5-aminolevulinic acid dehydratase, and free sulfhydryl groups in the erythrocytes of normal and lead-exposed persons*, Journal of Toxicology and Environmental Health, 4(1), 1978, s. 51-57.
33. WHO, *World Health Organization laboratory manual for examination of human semen and sperm-cervical mucus-interaction*, Cambridge University Press, Cambridge 1992.
34. Tkaczuk-Włach J., Robak-Chołubek D., Jakiel G., *Niepłodność męska*, Przegląd Menopauzalny, 5, 2006, s. 33-38.
35. Kumar N., Singh A.K., *Impact of environmental factors on human semen quality and male fertility. A narrative review*, Environmental Sciences Europe, 34, 2024.
36. Krzastek S.C., Farhi J., Gray M., Smith R.P., *Impact of environmental toxin exposure on male fertility potential*, Translational Andrology and Urology, 9, 2020, s. 2797-2813.

Immunohistochemiczna ocena ekspresji wybranych enzymów antyoksydacyjnych w najądrzu szczurów szczepu Wistar otrzymujących ołów i cynk

Streszczenie

Ludzkie najądrze zapewnia optymalne warunki dla dojrzewania i magazynowania plemników, m.in. poprzez ich ochronę przed atakiem oksydacyjnym za sprawą miejscowego działania przeciwutleniaczy. W najądrzu enzymatyczną ochronę antyoksydacyjną zapewnia m.in. dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza, peroksydaza glutationowa oraz reduktaza glutationowa. Ze względu na relatywnie długą obecność plemników w najądrzu – ulegać mogą one oddziaływaniu wielu substancji toksycznych. Prowadzone od lat w Katedrze i Zakładzie Histologii i Embriologii PUM badania wykazały, że indukowane ołowiem zmiany morfologiczne komórek nabłonkowych najądrza oraz stres oksydacyjny wpływają negatywnie na ilość i jakość obecnych tam plemników. W niniejszym badaniu wykorzystana została 4-tygodniowa postnatalna ekspozycja szczurów szczepu Wistar na ołów, cynk oraz ołów i cynk w celu odpowiedzi na pytania: czy w odniesieniu do warunków kontrolnych przewlekła intoksykacja ołowiem wpływa na poziom badanych enzymów o działaniu antyoksydacyjnym, a także czy cynk znosi wpływ ołowiu na ekspresję tych enzymów antyoksydacyjnych najądrza? Oceny dokonano metodą immunohistochemiczną z zastosowaniem pierwszorzędowych przeciwciał swoistych dla badanych enzymów. Immunoekspresję oraz immunolokalizację oceniano w mikroskopie świetlnym w sposób jakościowy, biorąc pod uwagę różnicę w intensywności barwnego (brązowego) odczynu w miejscu zajścia reakcji antygen-przeciwciało.

Na podstawie uzyskanych wyników udowodniono, że przewlekła ekspozycja na ołów powoduje zmianę ekspresji badanych enzymatycznych elementów bariery antyoksydacyjnej. Cynk natomiast znosi negatywny wpływ ołowiu na ekspresję tych enzymów.

Słowa kluczowe: najądrze, enzymy antyoksydacyjne, ołów, cynk

Immunohistochemical evaluation of antioxidant enzymes expression within epididymis of Wistar rats supplemented by lead and zinc

Abstract

Human epididymis provides the optimal conditions for spermatozoa storage and maturation, during which the local action of the antioxidant enzyme complex system protects the sperm cells from the oxidative stress. In the epididymis enzymatic antioxidant defense is provided by, among others, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase. For the reason that of spermatozoa relatively long presence in the epididymis, they could be exposed to many toxic substances. The studies conducted at the Department of Histology and Embryology of Pomeranian Medical University have shown that the lead induced morphological changes of epidididymal epithelial cells and the oxidative stress has a negative effect on the quantity and quality of the spermatozoa stored in the epididymis. A four-week-long postnatal exposure of Wistar rats to lead, zinc, and both lead and zinc has been used in this scientific experiment in order to answer the questions: if, in relation to the control conditions, the chronic lead intoxication impacts the antioxidant enzymes levels, and if zinc effectively reduces the impact of lead on the expression of these enzymes in epididymis. The evaluation was made by using the immunohistochemical reaction with an application of the specific primary antibodies against the examined enzymes. The immunoexpression and immunolocalization was assessed under the light microscope qualitatively, while taking into consideration the intensity of the colored (brown) difference at the antigen-antibody reaction site. Basing on the results, it was proved that the chronic exposure to lead causes the change of expression of the examined enzymatic elements of the antioxidant barrier, whereas zinc lowers lead's effect on the expression of these enzymes.

Keywords: epididymis, antioxidant enzymes, lead, zinc

Indeks Autorów

Banasiewicz J.	133
Baranowska-Bosiacka I.	158
Barszczewska-Rybarek I.	97
Bąchor R.	72
Bożejwicz D.	85
Buszewski B.	45
Chrószcz-Porębska M.	97
Dardas D.	120
Drejka P.	97
Dylewska K.	133
Filipowicz K.	108
Głowacka K.	45
Jesionowski T.	20
Jonczy I.	108
Khachatryan K.	147
Kirzyc M.	133
Kmiecik J.	158
Kolasa A.	158
Kołodziejczak-Radzińska A.	20
Konieczna-Molenda A.	35
Krakowska-Sieprawska A.	45
Milek J.	61
Nowacka Z.	120
Orzoł A.	45
Strugała M.	20
Studziński W.	85
Szultka-Młyńska M.	45
Trętowicz M.	72
Wasyłko W.	133
Wąsowicz I.	133
Wichrowska A.	133
Witt K.	85
Woszczak L.	147
Złoch M.	45