

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Wydział Chemii



**REAKCJE KOMPLEKSOWANIA CUKROWYCH POCHODNYCH
URYDYN-5'-DIFOSFORANU - CHARAKTERYSTYKA
SPEKTRALNA ORAZ BADANIA AKTYWNOŚCI BIOLOGICZNEJ**

Klaudia Stachowiak

Rozprawa doktorska

Zakład Chemii Koordynacyjnej

Wydział Chemii UAM

Promotorzy:

prof. dr hab. Renata Jastrząb

dr Michał Zabiszak

Poznań, 2025

Pani prof. dr hab. Renacie Jastrząb

*Składam najserdeczniejsze podziękowania
za opiekę merytoryczną, poświęcony czas, życzliwość
oraz wsparcie na każdym etapie mojej kariery naukowej.*

Panu dr Michałowi Zabiszakowi

*Serdecznie dziękuję
za okazaną pomoc, cenne rady
oraz dzielenie się swoim doświadczeniem naukowym.*

Rodzicom, rodzinie i przyjaciołom

*Dziękuję
za okazane wsparcie, cierpliwość oraz wiarę we mnie.*

Streszczenie

Celem niniejszej dysertacji było zbadanie procesu kompleksowania w układach zawierających cukrowe pochodne urydyno-5'-difosforanu z jonami metali bloku d o znaczeniu biologicznym oraz przeprowadzenie pełnej charakterystyki termodynamicznej i spektroskopowej wyznaczonych form kompleksowych. Ponadto przeprowadzono badania aktywności biologicznej wybranych form kompleksowych.

Pierwszy etap badań obejmował wyznaczenie stałych protonacji analizowanych ligandów: kwasu urydyno-5'-difosfoglukuronowego, urydyno-5'-difosfo-N-acetyloglukozaminy oraz urydyno-5'-difosfoglukozy z wykorzystaniem analizy potencjometrycznej prowadzonej w ściśle określonych warunkach: stałej siły jonowej ($0,1 \text{ mol/dm}^3$), temperatury ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) oraz w atmosferze gazu obojętnego, którym był hel. Dla każdej z otrzymanych form wyznaczono stałe protonacji ($\log\beta$) oraz stałe równowag tworzenia ($\log K_e$), a także sporządzono krzywe dystrybucji form, na podstawie których określono procentowy udział każdego z ligandów w tworzeniu danej formy. Następnie przeprowadzono badania potencjometryczne dla układów Cu(II)/UDP-GluA, Cu(II)/UDP-GlcNAc, Co(II)/UDP-GlcNAc, Ni(II)/UDP-GlcNAc, Cu(II)/UDP-Glc, Co(II)/UDP-Glc oraz Ni(II)/UDP-Glc w stosunkach molowych metalu do ligandu 1:1 oraz 1:2. Na podstawie otrzymanych danych określono typy form kompleksowych występujące w badanych układach oraz przeprowadzono ich charakterystykę termodynamiczną. Dla każdej z form kompleksowych wyznaczono ogólne stałe trwałości ($\log\beta$) oraz stałe równowag tworzenia ($\log K_e$) oraz zaproponowano reakcje otrzymywania tych form kompleksowych. Sporządzono krzywe dystrybucji form, na podstawie których wyznaczono pH dominacji analizowanych kompleksów oraz określono procentową zawartość jonów metali w ich strukturach.

Kolejnym etapem badań była analiza spektroskopowa i badania aktywności biologicznej wyznaczonych związków kompleksowych. Badania spektroskopowe UV-Vis, EPR, NMR oraz CD prowadzono w pH dominacji poszczególnych form. Na podstawie otrzymanych wyników badań wyznaczono skład wewnętrznej sfery koordynacyjnej oraz określono typy chromoforu występujące w analizowanych układach. Badania spektroskopowe NMR prowadzone były we współpracy z Instytutem Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Wstępne badania aktywności biologicznej prowadzone były we współpracy z Collegium Medicum Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Bydgoszczy dla wybranych form kompleksowych zawierających w swojej strukturze jony miedzi(II). Do przeprowadzenia badań wykorzystano linie A549 (komórki raka płuc), T2H (komórki raka pęcherza moczowego) oraz SV HUC-1 (komórki nabłonka urotelialnego – zdrowe komórki pęcherza moczowego). Komórki

indukowano z analizowanych związkami kompleksowymi oraz ligandami przez 24 oraz 72 godziny. Na podstawie otrzymanych wyników określono właściwości cytotoksyczne otrzymanych kompleksów względem wolnych ligandów.

Wykonane pomiary poszerzą wiedzę na temat związków kompleksowych cukrowych pochodnych urydino-5'-difosforanu oraz ich właściwości spektroskopowych i biologicznych.

Słowa kluczowe: cukrowe pochodne urydino-5'-difosforanu, jony metali bloku d, związki kompleksowe, badania potencjometryczne, badania spektroskopowe, badania biologiczne.

Abstract

The aim of this dissertation was to investigate the complexation process in systems containing sugar derivatives of uridine-5'-diphosphate with biologically relevant d-block metal ions, as well as to conduct a thermodynamic and spectroscopic characterization of the identified complex forms. In addition, the biological activity of selected complex species was examined.

The first stage of the study included determining the protonation constants of the analyzed ligands: uridine-5'-diphosphoglucuronic acid, uridine-5'-diphospho-N-acetylglucosamine, and uridine-5'-diphosphoglucose, using potentiometric analysis under strictly defined conditions: constant ionic strength (0.1 mol/dm^3), temperature ($20 \pm 1^\circ\text{C}$), and an inert gas atmosphere. For each of the obtained forms, protonation constants ($\log\beta$) and equilibrium constants of the formation reaction ($\log K_e$) were determined. Distribution curves were plotted to assess the percentage contribution of each ligand to the formation of a given species. Subsequently, potentiometric measurements were conducted for the Cu(II)/UDP-GluA, Cu(II)/UDP-GlcNAc, Co(II)/UDP-GlcNAc, Ni(II)/UDP-GlcNAc, Cu(II)/UDP-Glc, Co(II)/UDP-Glc, and Ni(II)/UDP-Glc systems at metal-to-ligand molar ratios of 1:1 and 1:2. Based on the obtained data, the types of complex species present in the studied systems were identified, and their thermodynamic characteristics were established. For each complex species, overall stability constants ($\log\beta$) and equilibrium constants of the formation reaction ($\log K_e$) were calculated, and the corresponding formation reactions were proposed. Distribution curves were plotted to determine the pH ranges in which the analyzed complexes dominate, as well as the percentage content of metal ions within their structures.

The next stage of the research included spectroscopic analysis and biological activity assays of the selected complex compounds. UV-Vis, EPR, NMR, and CD spectroscopic studies were carried out at the pH values where each form predominates. The results allowed for the determination of the composition of the inner coordination sphere and identification of the chromophore types present in the analyzed systems. NMR spectroscopy was conducted in collaboration with the Institute of Bioorganic Chemistry of the Polish Academy of Sciences in Poznań. Preliminary biological activity studies were carried out in collaboration with the Collegium Medicum of the Nicolaus Copernicus University in Bydgoszcz on selected complexes containing copper(II) ions. Lines A549 (lung cancer cells), T2H (bladder cancer cells), and SV HUC-1 (normal urothelial bladder epithelial cells) were used for the study. Cells were incubated with the analyzed complex compounds and ligands for 24 and 72 hours. On the basis of the results obtained, the cytotoxic properties of the complexes obtained against free ligands were determined.

The performed measurements will extend the knowledge of complex compounds of sugar uridine-5'-diphosphate derivatives and their spectroscopic and biological properties.

Keywords: sugar derivatives of uridine-5'-diphosphate, d-block metal ions, complex compounds, potentiometric studies, spectroscopic studies, biological studies.

Spis treści

1. Wstęp.....	9
2. Spis stosowanych skrótów i symboli	11
3. Część teoretyczna	12
3.1. Analogi nukleotydów i nukleozydów w ujęciu terapeutycznym	12
3.2. Cukrowe pochodne urydyno-5'-difosforanu.....	14
3.2.1. Kwas urydyno-5'-difosfoglukuronowy	18
3.2.2. Urydyno-5'-difosfo-N-acetyloglukozamina.....	20
3.2.3. Urydyno-5'-difosfoglukoz.....	22
3.3. Jony metali o znaczeniu biologicznym	24
3.3.1. Metale bloku d – miedź, nikiel i kobalt	28
3.4. Charakterystyka metod badawczych	36
3.4.1. Miareczkowanie potencjometryczne.....	36
3.4.2. Spektroskopia UV-Vis	38
3.4.3. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)	42
3.4.4. Spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR)	44
3.4.5. Spektroskopia dichroizmu kołowego (CD).....	46
3.4.6. Badania biologiczne – badania MTT	48
4. Cel pracy.....	50
5. Część eksperymentalna.....	51
5.1. Badane ligandy	51
5.2. Badane układy	52
5.3. Spis stosowanej aparatury	53
5.4. Spis stosowanych odczynników.....	54
5.5. Miareczkowanie potencjometryczne.....	55
5.6. Spektroskopia UV-Vis	58
5.7. Spektroskopia NMR	60
5.8. Spektroskopia EPR	61
5.9. Spektroskopia CD.....	62
5.10. Badania biologiczne	63
6. Wyniki i Dyskusja.....	64
6.1.1. Protonacja ligandów	64
6.2. Układ jon metalu/kwas urydyno-5'-difosfoglukuronowy.....	67
6.2.1. Badania biologiczne	74
6.3. Jon metalu/urydyno-5'-difosfo-N-acetyloglukozamina	76
6.3.1. Układ Cu(II)/UDP-GlcNAc.....	76

6.3.2.	Układ Co(II)/UDP-GlcNAc.....	80
6.3.3.	Układ Ni(II)/UDP-GlcNAc	83
6.3.4.	Porównanie wyników badań dla układów jon metalu(II)/UDP-GlcNAc	86
6.3.5.	Badania biologiczne	87
6.4.	Jon metalu/urydyno-5'-difosfoglukoz.....	89
6.4.1.	Układ Cu(II)/UDP-Glc.....	89
6.4.2.	Układ Co(II)/UDP-Glc.....	92
6.4.3.	Układ Ni(II)/UDP-Glc	95
6.4.4.	Porównanie wyników badań dla układów jon metalu(II)/UDP-Glc.....	98
7.	Podsumowanie.....	99
8.	Bibliografia.....	101
9.	Dorobek naukowy	111
10.	Załączniki.....	115

1. Wstęp

Nukleotydy i nukleozydy to cząsteczki kluczowe do prawidłowego funkcjonowania organizmów żywych. Związki te są nie tylko elementami budulcowymi kwasów nukleinowych (DNA i RNA), ale również pełnią istotne funkcje w procesach energetycznych (ATP, GTP), sygnalizacji komórkowej oraz regulacji enzymatycznej. Udział nukleotydów i nukleozydów w wielu różnych procesach biologicznych zachodzących w organizmie sprawia, że związki te znalazły się w kręgu zastosowań różnych gałęzi medycyny, jako potencjalne środki terapeutyczne. Są podstawą licznych leków przeciwwirusowych i przeciwnowotworowych, takich jak rybawiryna, acyklowir, czy cytarabina. Cytotoksyczność tych związków została potwierdzona, m.in.: na liniach komórkowych raka piersi czy jelita grubego.

Prace nad znalezieniem skutecznego chemoterapeutyku charakteryzującego się jednocześnie niewielkim wpływem na organizm człowieka trwają od wielu lat. Coraz większe zainteresowanie, oprócz związków nieorganicznych, wzbudzają pochodne makromolekuł, które występują w organizmie człowieka. W tej grupie znajdują się, m.in.: cukrowe pochodne fosforanów urydyny oraz ich związki kompleksowe z jonami metali.

Cukrowe pochodne urydyno-5'-difosforanu, takie jak UDP-glukoza, UDP-N-acetyloglukozamina, czy UDP-galaktoza odgrywają kluczową rolę w prawidłowym funkcjonowaniu organizmów żywych. Uczestniczą w procesach syntezy glikolipidów, glikoprotein oraz proteoglikanów, gdzie pełnią rolę donorów jednostek cukrowych. Monitorowanie stężenia tych związków w organizmie jest szczególnie istotne, z uwagi na ich znaczenie w przebiegu, np.: chorób nowotworowych czy neurodegeneracyjnych. Enzymy, zaangażowane w syntezę tej grupy związków u bakterii, uważane są za potencjalne cele terapeutyczne w procesach projektowania leków przeciwbakteryjnych. Charakter hydrofilowy oraz występowanie licznych atomów donorowych w cząsteczkach cukrowych pochodnych nukleotydów czyni z nich doskonałe ligandy w związkach kompleksowych.

Istotną rolę w procesach biologicznych, które zachodzą w organizmach żywych odgrywają jony metali przejściowych, takie jak Cu^{2+} , Zn^{2+} , $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, Co^{2+} , Mn^{2+} czy Ni^{2+} . Jony te pełnią funkcje kofaktorów wielu enzymów, a także stabilizują struktury białkowe i wpływają na prawidłową pracę komórek mięśniowych czy nerwowych. Zaburzenia stężenia jonów metali w organizmie związane jest z występowaniem wielu stanów patologicznych, w tym anemii, cukrzycy i chorób przewlekłych. Związki metali przejściowych wykazują właściwości przeciwdrobnoustrojowe i przeciwnowotworowe, co przyczynia się do ich szerokiego zastosowania w medycynie i farmacji. Dużym zainteresowaniem cieszy się również znaczenie jonów metali bloku d w indukowaniu śmierci komórek, m.in.: poprzez mechanizm apoptozy.

Kompleksy zawierające cukrowe pochodne urydyno-5'-difosforanu, w tym urydyno-5'-difosfoglukozę, kwas urydyno-5'-difosfoglukuronowy i urydyno-5'-difosfo-N-acetyloglukozaminę, sprzężone z d-elektronowymi jonami metali są bardzo obiecujące w dziedzinie biochemii i medycyny. Wynika to z ich zaangażowania w procesy enzymatyczne oraz metabolizm węglowodanów. Połączenie właściwości jonów metali o znaczeniu biologicznym z cukrowymi pochodnymi urydyno-5'-difosforanu może przyczynić się do rozwoju nowych metod terapeutycznych, np.: w leczeniu chorób nowotworowych. Mogą one działać jako inhibitory enzymów, które biorą udział w procesach glikozylacji lub być wykorzystywane jako cząsteczki sygnałowe w terapii celowanej. Ponadto mogą pełnić rolę transporterów leków do określonych komórek organizmu.

W poniższej dysertacji zestawiono wyniki badań potencjometrycznych, spektroskopowych oraz biologicznych kompleksów cukrowych pochodnych urydyno-5'-difosforanu (kwasu urydyno-5'-difosfoglukuronowego, urydyno-5'-difosfo-N-acetyloglukozaminy oraz urydyno-5'-difosfoglukozy) z jonami metali bloku d (Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+}).

2. Spis stosowanych skrótów i symboli

UDP-GluA	kwasy urydyno-5'-difosfoglukuronowy
UDP-Glc	urydyno-5'-difosfoglukozę
UDP-GlcNAc	urydyno-5'-difosfo-N-acetyloglukozamina
UDP	urydyno-5'-difosforan
GDP	guanozyno-5'-difosforan
CMP	cytydyno-5'-monofosforan
UDP-Gal	urydyno-5'-difosfogalaktozę
UDP-GalNAc	urydyno-5'-difosfo-N-acetylogalaktozamina
UDP-Xyl	urydyno-5'-difosfoksylozę
GDP-Fuc	guanozyno-5'-difosfofruktozę
GDP-Man	guanozyno-5'-difosfomannozę
CMP-Neu-5-Ac	kwasy cytydyno-5'-monofosfo-N-acetylneuraminowy
GTs	glikozylotransferazy
NDP	nukleotydy difosforan
NMP	nukleotydy monofosforan
NTP	nukleotydy trifosforan
Sia	kwasy sialowy
Gal	galaktozę
Glc	glukozę
Fuc	fukozę
Xyl	ksylozę
Man	mannozę
GlcNAc	N-acetylogalaktozamina
GlcNAc	N-acetyloglukozamina
S	serotonina
T	treonina
UGD	dehydrogenaza UDP-glukozy
UXS	synteza UDP-Xyl
UGT	UDP - glukuronozylotransferazy
NSTs	transportery cukrów nukleotydowych
UGTrel7	białko 7 związane z transporterem UDP-galaktozy
GAGs	glikozaminoglikany
GlmU	urydylotransferaza N-acetyloglukozamino-1-fosforanu
HK	heksokinaza
Pgm	fosfoglukomutaza
UDPG	pirofosforylaza UDP-glukozy
λ	długość fali
ϵ	współczynnik ekstynkcji
%T	transmitancja
A	absorbancja
SEM	siła elektromotoryczna
HA	kwasy hialuronowy
A549	komórki raka płuc
T2H	komórki raka pęcherza moczowego
F-12K	podłoże do hodowli komórek
SV HUC 1	komórki nabłonka urotelialnego

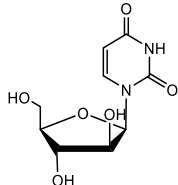
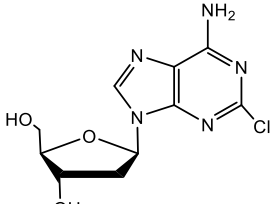
3. Część teoretyczna

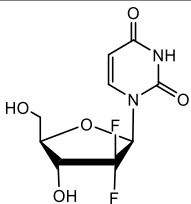
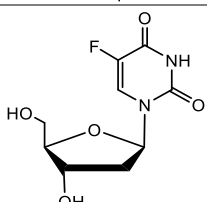
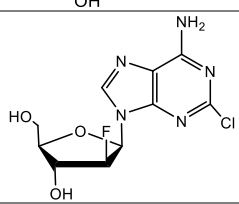
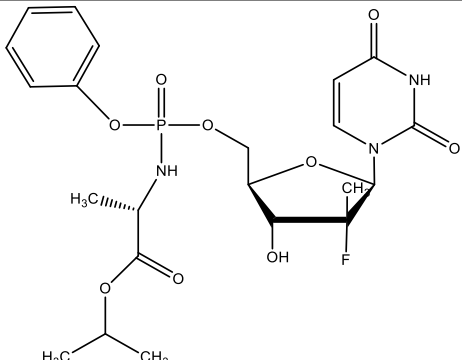
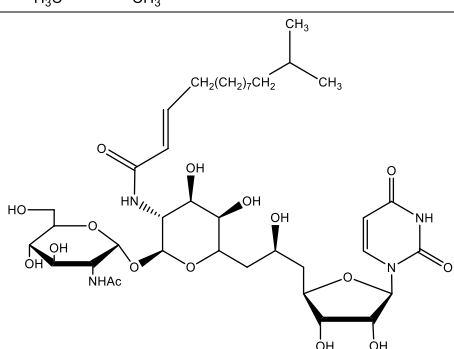
3.1. Analogi nukleotydów i nukleozydów w ujęciu terapeutycznym

W ostatnich latach coraz większym zainteresowaniem cieszą się preparaty stosowane w leczeniu chorób nowotworowych oraz infekcji wirusowych. Obecnie stosowane związki terapeutyczne charakteryzują się jednak pewnymi ograniczeniami, przede wszystkim wynikającymi z ich toksyczności, co przekłada się na obniżenie skuteczności stosowanego leczenia. Z tego względu istotne jest opracowanie skutecznych środków terapeutycznych o niskiej toksyczności. Zsyntetyzowane analogi nukleozydów, stosowane w medycynie od ponad 50 lat, otrzymywane są przez modyfikację nukleozydów purynowych i pirymidynowych. Mimo długoletniego zastosowania, ich biodostępność po podaniu doustnym jest ograniczona [1-3].

Europejska Agencja Leków (EMA) oraz Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (FDA) zatwierdziły szereg pochodnych nukleozydów jako substancje czynne w lekach przeciwnowotworowych. Pierwszą zatwierdzoną substancją była cytarabina, wykorzystywana głównie w hematologii do leczenia ostrej białaczki szpikowej. Cytarabina jest analogiem cytydyny, w którym ryboza została zastąpiona przez arabinozę. Do innych ważnych pochodnych nukleozydów należą gemcytabina, floksurydyna, kladrybina oraz kłofarabina (Tabela 1). Związki te są pochodnymi deoksycytydyny, deoksyadeniny i deoksyguanozyny. Modyfikacje grupy cukrowej w ich cząsteczkach często obejmują podstawienie fluorowców takich jak chlor czy fluor. Cytotoksyczność tych związków była badana na różnych liniach komórek nowotworowych, m. in.: raka jajnika, raka piersi czy raka jelita grubego [1,4,5].

Tabela 1. Wzory strukturalne analogów nukleozydów [1,6].

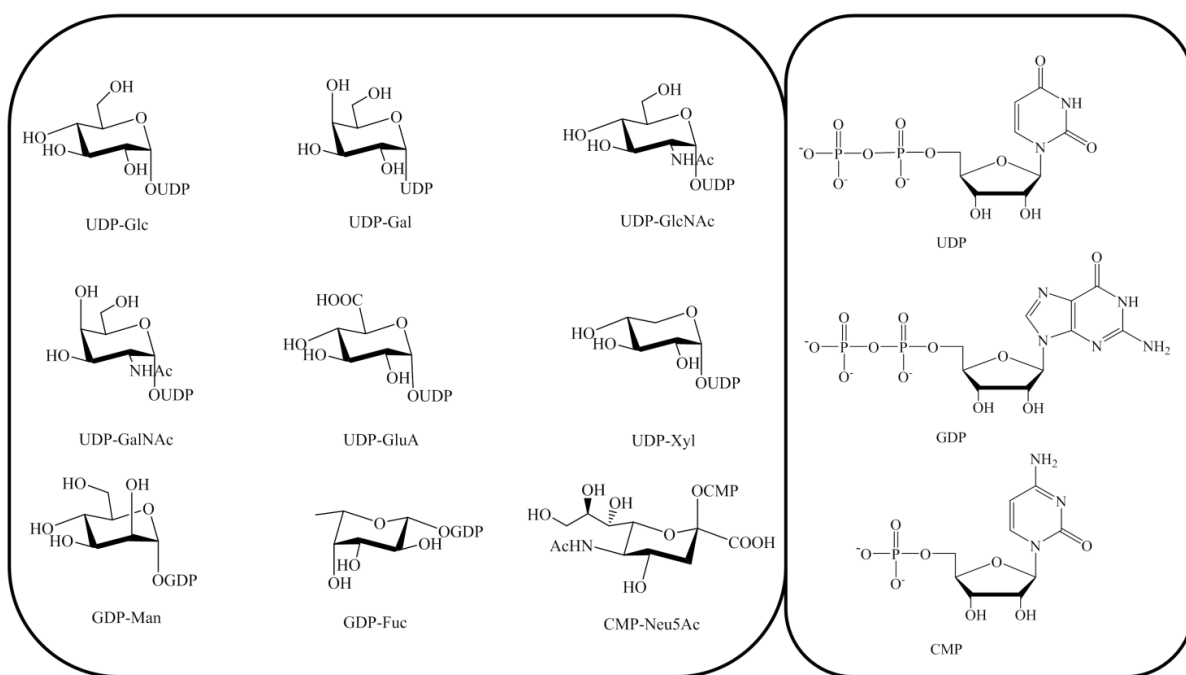
Nazwa	Wzór strukturalny	Właściwości
Cytarabina		czynnik przeciwnowotworowy
Kladrybina		czynnik przeciwnowotworowy

Gemcytabina		czynnik przeciwnowotworowy
Floksurydyna		czynnik przeciwnowotworowy
Klofarabina		czynnik przeciwnowotworowy
Sofosbuwir		czynnik przeciwwirusowy
Tunikamycyna		czynnik przeciwwirusowy

Związki te, oprócz aktywności przeciwnowotworowej, mogą być również stosowane w leczeniu chorób wątroby, zakażeń wirusowych, a także malarii. Ponadto znajdują zastosowanie są jako leki immunosupresyjne w terapii chorób autoimmunologicznych oraz w transplantologii [1]. Dodatkowo wykazano, że pochodne cukrowe urydyny oraz ich analogi, zawierające modyfikacje zarówno w obrębie zasady azotowej, jak i części cukrowej, mogą stanowić podstawę nowych terapii w leczeniu zakażeń wirusem grypy typu A oraz wirusem zapalenia wątroby typu C [6-8]. Leki oparte na analogach nukleotydów i nukleozydów, podobnie jak inne leki antymetaboliczne, cechują się krótkim okresem półtrwania, wąskim zakresem terapeutycznym oraz dużą zmiennością parametrów farmakokinetycznych [4].

3.2. Cukrowe pochodne urydyno-5'-difosforanu

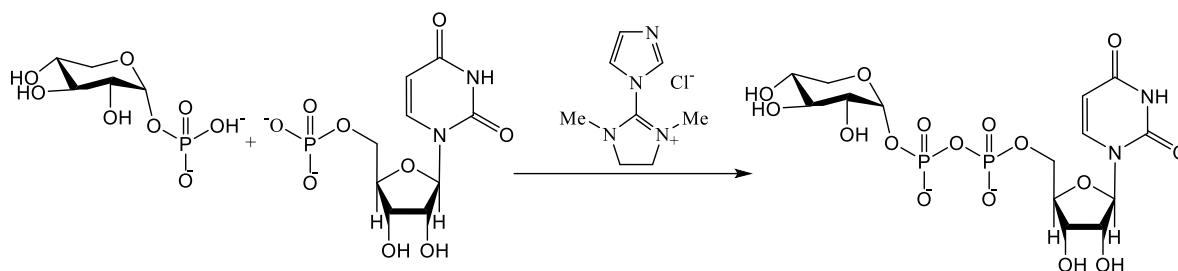
Cukrowe pochodne mono- oraz difosforanów nukleozydów odgrywają istotną rolę w procesach niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmów żywych. Pełnią one funkcję donorów glikozylowych, m.in.: w syntezie glikolipidów i glikoprotein oraz uczestniczą w reakcjach katalizowanych przez glikozylotransferazy (GTs) [9-11]. Enzymy te zaangażowane są w wiele kluczowych procesów biologicznych, dlatego też stanowią podmiot zainteresowania jako potencjalne środki farmaceutyczne. U człowieka występuje jedynie dziewięć donorów glikozylowych (Rys. 1), określanych mianem donorów Leloir [12]. Cząsteczki te zbudowane są z nukleozydów (cytydino-5'-monofosforanu (CMP), guanozyno-5'-difosforanu (GDP) oraz urydyno-5'-difosforanu (UDP)), monosacharydów: aldopentoz (ksylozy), aldoheksoz (fukozy, mannozy, glukozy, galaktozy), aldoheksozamin (glukozaminy, galaktozaminy), kwasów uronowych (kwasu D-glukuronowego) oraz kwasów siałowych (kwasu N-acetyloneuraminowego) [10,13].



Rys. 1. Cukrowe pochodne nukleotydów występujących w organizmie człowieka [10,13].

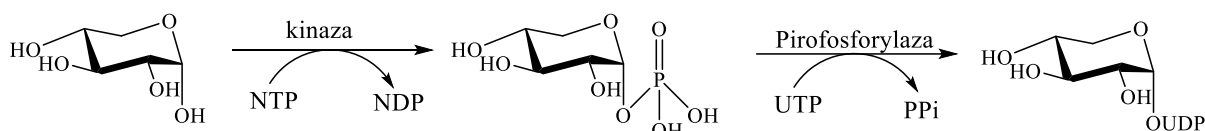
Metody syntezy nukleotydów cukrowych dzielą się na chemiczne i enzymatyczne [10,11,14]. Chemiczna metoda syntezy cukrowych pochodnych nukleotydów zachodzi poprzez bezpośrednie sprzęganie difosforanu nukleotydu z aktywowaną cząsteczką cukru, zazwyczaj w postaci bromku monosacharydu. Alternatywny szlak chemicznej syntezy cukrowych pochodnych nukleotydów obejmuje reakcję kondensacji aktywowanego monofosforanu

nukleotydu z fosforanową pochodną monosacharydu, w obecności heterocyklicznych katalizatorów zawierających atom azotu, np.: imidazolu (Schemat 1) [11, 14-16].



Schemat 1. Chemiczna synteza UDP-Xyl wykorzystująca mechanizm kondensacji aktywowanego NMP [11,15].

Enzymatyczna synteza cukrowych pochodnych difosforanów nukleotydów może przebiegać dwoma głównymi szlakami: biosyntezy ratunkowej (salvage biosynthesis pathway) oraz biosyntezy *de novo*. Schemat ratunkowy (Schemat 2) obejmuje przekształcenie monosacharydu do jego pochodnej fosforanowej w reakcji z NTP, katalizowanej przez kinazę, a następnie sprzęganie z odpowiednim NTP w obecności pirofosforylasy. Z kolei synteza *de novo* obejmuje m.in. procesy aminowania, acetylacji, dehydratacji, czy izomeryzacji istniejących nukleotydów cukrowych [14,17,18].



Schemat 2. Enzymatyczna synteza UDP-Xyl wykorzystująca szlak biosyntezy ratunkowej [18].

Procesy glikozylacji z udziałem urydyno-5'-difosforanowych pochodnych cukrowych stanowią jedne z najważniejszych mechanizmów modyfikacji białek w organizmie. Wpływają one na komunikację międzykomórkową, stabilność cząsteczek oraz ich immunogenność [19,20]. Mutacje wpływające na syntezę glikanów podczas procesu glikozylacji mogą prowadzić do poważnych zaburzeń funkcjonowania organizmu takich jak choroby tkanki łącznej i układu kostnego, a także do rozwoju schorzeń neurodegeneracyjnych, np. choroby Alzheimera [9]. Wiele glikoprotein i glikolipidów pełni rolę markerów diagnostycznych (Tabela 2) wykorzystywanych w rozpoznawaniu zmian patologicznych oraz monitorowaniu terapii, m.in.: w chorobach nowotworowych i cukrzycy [9,21,22]. Nieprawidłowości w procesach glikozylacji potwierdzono dla wielu typów nowotworów, a zmienione glikany oraz glikoproteiny odgrywają istotne role w rozwoju i progresji nowotworów, np.: piersi,

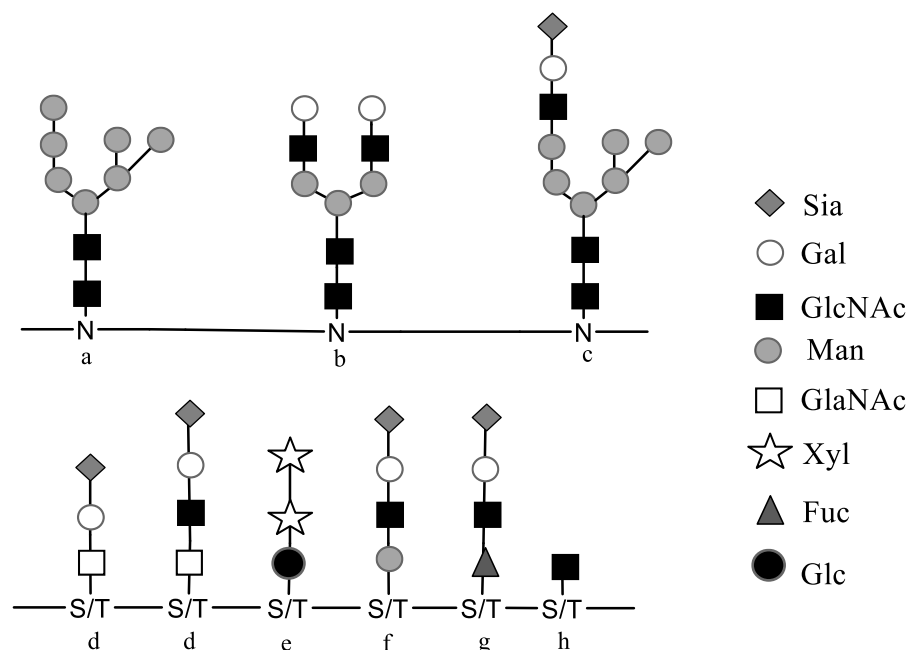
prostaty, tarczycy, jąder czy jajników [20,23,24]. Obecność obcych lub zmodyfikowanych sekwencji glikanów w organizmie może aktywować mechanizmy obronne, co stało się podstawą badań nad wykorzystaniem glikanów w szczepionkach przeciwko infekcjom bakteryjnym [25,26], grzybiczym [27] oraz nowotworom [26,28].

Tabela 2. Najczęściej stosowane biomarkery nowotworowe oraz ich zastosowania w terapii klinicznej [21,23,24,29-31].

Biomarker nowotworowy	Rodzaj nowotworu	Zastosowanie
tyreoglobulina	tarczycza	monitorowanie
antygen rakowo- płodowy	okreźnica	badania przesiewowe monitorowanie wykrywanie przerzutów określenie rokowania
specyficzny antygen prostaty	prostata	diagnostyka badania przesiewowe
alfa-fetoproteina	wątroba	diagnostyka monitorowanie
Mucyna 1 (CA15-3)	piersi	terapia monitorująca
Mucyna 16 (CA125)	jajniki	określenie rokowania wykrywanie nawrotów terapia monitorująca
Receptor 2 ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu (HER2)	piersi	terapia celowana
Ludzka gonadotropina kosmówkowa (hCG)	jądra	wykrywanie nawrotów terapia monitorująca diagnoza
CA19-9	trzustka	terapia monitorująca określenie rokowania
CA72-4	żóładek	określenie rokowania monitorowanie

Przyłączenie łańcuchów bocznych cukrów do białek i peptydów za pomocą wiązań N- i O-glikozydowych umożliwia tworzenie specyficznych sekwencji N-glikanów i O-glikanów. N-glikany są zazwyczaj przyłączane do grupy γ -aminowej w cząsteczce asparaginy. Wyróżnia się trzy główne podtypy N-związanych glikanów: typ wysokomannozowy (Rys. 2a), typ dwuantenowy (Rys. 2b) oraz typ hybrydowy (Rys. 2c). O-połączone glikany wiążą się z grupą hydroksylową ($-OH$) seryny lub treoniny. Ich klasyfikacja zależy od rodzaju cukru przyłączonego do aminokwasu. Do najważniejszych typów O-glikanów należą: O-mucyny/O-GalNAc (Rys. 2d), O-glukozy (Rys. 2e), O-mannozy (Rys. 2f), O-fukozy (Rys. 2g) oraz O-GlcNAc (Rys. 2h). Proces biosyntezy zarówno

N- i O-glikanów zachodzi w aparacie Golgiego oraz w retikulum endoplazmatycznym [10,32,33].

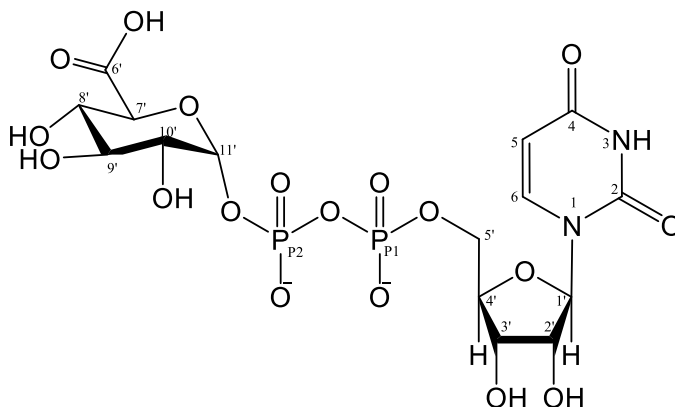


Rys. 2. Dwa główne typy glikozylacji białek (2a-typ wysokomannozowy, 2b-typ dwuantenowy, 2c-typ hybrydowy, 2d- O-mucyny/O-GalNAc, 2e- O-glukozy, 2f- O-mannozy, 2g- O-fukozy, 2h- O-GlcNAc) [10,21].

Cukrowe pochodne nukleotydów (NDP) odgrywają również istotną rolę w funkcjonowaniu receptorów P2Y sprzężonych z białkami G (GPCR) które biorą udział m.in. w terapii przeciwzakrzepowej, regulacji układu krwionośnego i odpornościowego, a także w leczeniu stanów zapalnych, cukrzycy oraz chorób płuc, takich jak mukowiscydoza. Jednym z ważniejszych przedstawicieli tej grupy jest receptor P2Y₁₄, aktywowany przez urydyno-5'-difosfoglukozę oraz inne pochodne urydyno-5'-difosforanu, np.: UDP-galaktozę oraz UDP-N-acetyloglukozaminę. Receptor ten występuje on w takich tkankach organizmu jak: łożysko, płuca, śledziona czy mózg oraz odgrywa istotną rolę we wspólnym funkcjonowaniu układu odpornościowego i nerwowego [34-36].

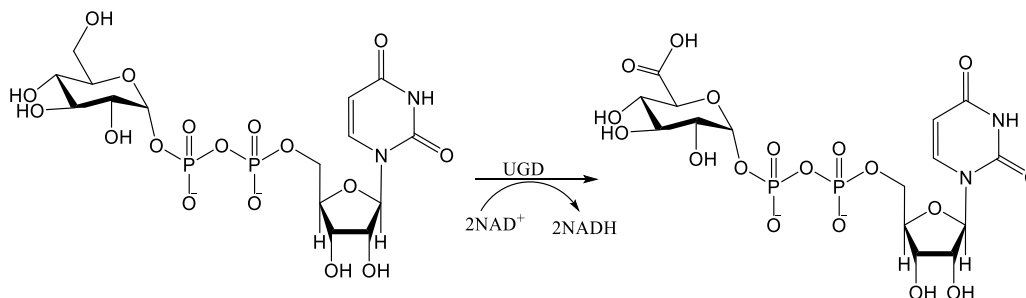
3.2.1. Kwas urydyno-5'-difosfoglukuronowy

Kwas urydyno-5'-difosfoglukuronowy (UDP-GluA) (Rys. 3) to cukrowa pochodna urydyno-5'-difosforanu zbudowana z urydyno-5'-difosfoglukozy oraz kwasu D-glukuronowego, który zaliczany jest do grupy kwasów uronowych, a w swojej strukturze zawiera grupy hydroksylowe oraz grupę karboksylową [37,38].



Rys. 3. Wzór strukturalny kwasu urydyno-5'-difosfoglukuronowego [37].

Synteza UDPGluA polega na utlenieniu grupy hydroksymetylowej ($-\text{CH}_2\text{OH}$) w cząsteczce UDP-Glukozy (UDP-Glc) do grupy karboksylowej ($-\text{COOH}$) w obecności enzymu dehydrogenazy UDP-glukozy (UGD). Reakcja ta zachodzi z jednoczesną redukcją dwóch cząsteczek NAD^+ do NADH (Schemat 3) [39-41].



Schemat 3. Reakcja otrzymywania UDP-GluA w obecności UGD jako katalizatora [41].

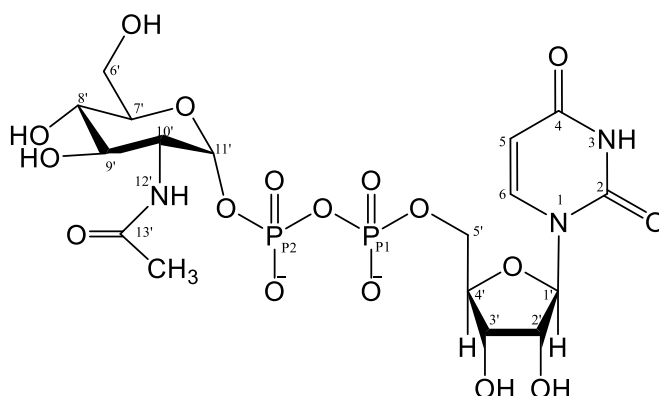
Glukuronidacja to jeden z kluczowych procesów detoksykacji, umożliwiający eliminację z organizmu endogennych związków, leków oraz toksyn takich jak hormony steroidowe, bilirubina, ksenobiotyki czy utlenione kwasy tłuszczowe. Reakcje te zachodzą w wątrobie i są katalizowane przez enzymy z rodziny UDP-glukuronozylotransferaz (UGT), których niezbędnym substratem jest kwas urydyno-5'-difosfoglukuronowy. UGT katalizują przeniesienie kwasu D-glukuronowego z cząsteczki UDP-GluA na związki przeznaczone do eliminacji [38,42-44]. Transport UDP-GluA z cytozolu, miejsca syntezy, do retikulum

endoplazmatycznego, odbywa się z udziałem transporterów cukrów nukleotydowych (NSTs). Do tej grupy zalicza się transporter UGTrel7 (białko związane z transporterem UDP-galaktozy) odpowiedzialny za transport zarówno UDP-GluA, jak i UDP-Gal [43,45]. Zaburzenia ekspresji lub aktywności UGT mogą prowadzić do występowania zespołu Gilberta, zespołu Criglera-Najjara typu I i II, a także do nieprawidłowego metabolizmu niektórych leków, np.: acetaminofenonu, atazanawiru czy tamoksifenu [46,47].

Kwas urydyno-5'-difosfoglukuronowy odgrywa także istotną rolę w biosyntezie glikozaminoglikanów (GAGs), takich jak: kwas hialuronowy (HA) oraz heparyna. Związki te pełnią istotną rolę w sygnalizacji komórkowej oraz regeneracji tkanek. Oprócz UDP-GluA będącego donorem kwasu D-glukuronowego, w biosyntezie HA i heparyny uczestniczy również UDP-GlcNAc, jako donor N-acetyloglukozaminy. W procesie tworzenia heparyny, reszta kwasu glukuronowego jest przekształcana do kwasu idurowego, z udziałem odpowiednich enzymów [48-51]. Ponadto kwas urydyno-5'-difosfoglukuronowy uczestniczy w biosyntezie polisacharydów, takich jak pektyny, oraz monosacharydów, np.: ksylozy lub kwasu galaktouronowego, które następnie wchodzi w skład polisacharydów ścian komórkowych, a także jest donorem kwasu D-glukuronowego w szlaku syntezy kwasu askorbinowego u ssaków [52-54]. Dodatkowo, UDP-GluA może być przekształcany do UDP-ksylozy (UDP-Xyl) w obecności enzymu syntazy UDP-Xyl(UXS). Reakcja ta przebiega poprzez dekarboksylację grupy karboksylowej ($-\text{COOH}$) przy atomie węgla C(6) w cząsteczce kwasu D-glukuronowego [39,53].

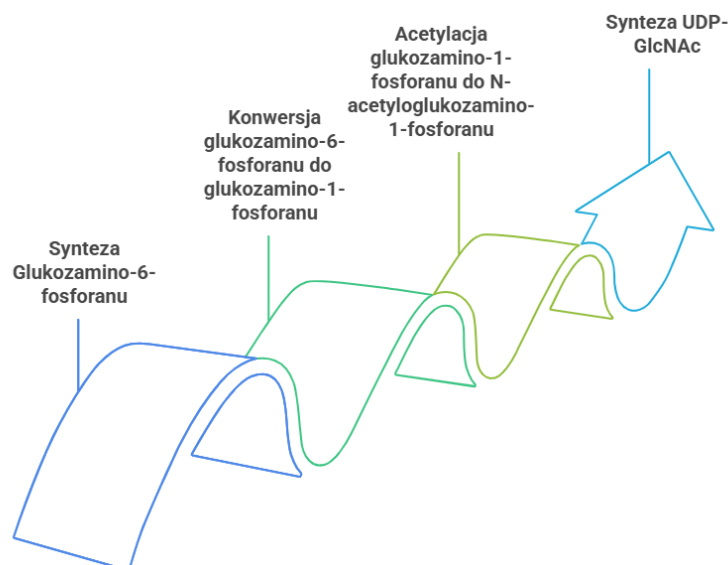
3.2.2. Urydyno-5'-difosfo-N-acetyloglukozamina

Urydyno-5'-difosfo-N-acetyloglukozamina (UDP-GlcNAc) (Rys. 4) to cukrowa pochodna urydyno-5'-difosforanu, niezbędna w wielu procesach biologicznych, np.: syntezie glikoprotein, glikolipidów, proteoglikanów, a także w bakteryjnych szlakach biosyntezy, m.in.: kanamycyny, gentamycyny czy neomycyny. Obecność UDP-GlcNAc w organizmie wiąże się również z niektórymi stanami patologicznymi, np.: kardiomiopatią cukrzycową oraz insulinoopornością [55-57].



Rys. 4. Wzór strukturalny urydyno-5'-difosfo-N-acetyloglukozaminy [56].

Metody otrzymywania UDP-GlcNAc, obejmują metody chemiczne, enzymatyczne, chemoenzymatycznie, a także fermentacyjne. Biosynteza UDP-GlcNAc zachodzi w kilku etapach enzymatycznych (Schemat 4): synteza glukozamino-6-fosforanu z fruktozo-6-fosforanu i glutaminy lub alternatywnie — fosforylacja glukozaminy przez heksokinazy; konwersja glukozamino-6-fosforanu do glukozamino-1-fosforanu; acetylowanie glukozamino-1-fosforanu do N-acetyloglukozamino-1-fosforanu; synteza UDP-GlcNAc z N-acetyloglukozamino-1-fosforanu oraz UTP w obecności fosforylasy UDP-GlcNAc. Istnieją również uproszczone warianty biosyntezy, w których jako substrat wyjściowy stosuje się bezpośrednio N-acetyloglukozaminę [57-59].



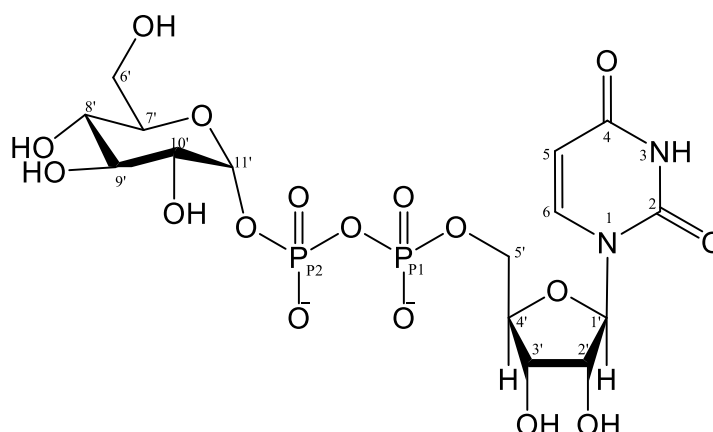
Schemat 4. Etapy biosyntezy urydyno-5'-difosfo-N-acetylglukozaminy.

UDP-GlcNAc to aktywna forma aminocukru, N-acetylglukozaminy, stanowiącą prekursor elementów strukturalnych ściany komórkowej bakterii i grzybów. Enzymy zaangażowane w jej biosyntezę u mikroorganizmów są interesującym celem w projektowaniu leków przeciwbakteryjnych. Enzym GlmU, katalizujący ostatni etap szlaku, czyli przekształcanie glukozamino-1-fosforanu w UDP-GlcNAc, uznawany jest za potencjalny cel terapeutyczny w leczeniu gruźlicy. Inhibicja enzymów biorących udział w tym szlaku prowadzi do utraty integralności ściany komórkowej, a w konsekwencji do śmierci komórki [60,61]. Podobnie jak UDP-GluA, UDP-GlcNAc jest donorem N-acetylglukozaminy glikozaminoglikanów, takich jak kwas hialuronowy (HA) i heparyna [49]. Podwyższone stężenia HA obserwuje się w wielu typach nowotworów m.in. w raku piersi, gdzie zwiększony poziom UDP-GlcNAc koreluje z przyspieszoną syntezą HA oraz progresją choroby. [62].

UDP-GlcNAc jest niezbędnym substratem procesów O-GlcNAcytacji, potranslacyjnej modyfikacji białek, które mogą być zaburzone podczas stanów chorobowych takich jak, cukrzyca, choroby nowotworowe, czy choroby neurodegeneracyjne [63-65]. Stężenie UDP-GlcNAc stanowi jeden z głównych czynników regulujących glikozylację. Zwiększone rozgałęzienie oligosacharydów zaobserwowano w komórkach czerniaka B16, które inkubowane były w obecności N-acetylglukozaminy [66]. Mutacje w głównym transporterze UDP-GlcNAc (SLC35A3) wykryto u pacjentów z zaburzeniami ze spektrum autyzmu, padaczką oraz artrogrypozą [67]. Rola, jaką odgrywa UDP-GlcNAc w metabolizmie, sygnalizacji komórkowej oraz w przebiegu wielu schorzeń, wskazuje na potrzebę opracowania skutecznych metod monitorowania jego poziomu w organizmach żywych [63].

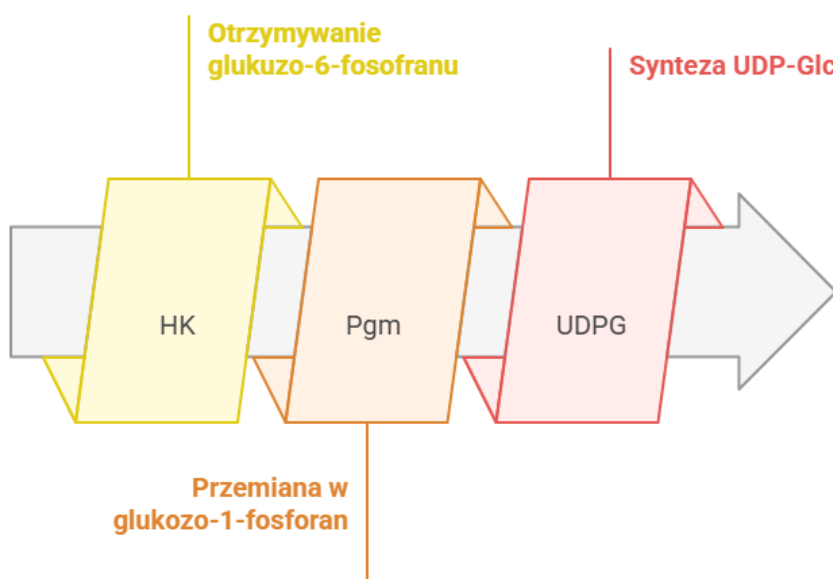
3.2.3. Urydyno-5'-difosfoglukoza

UDP-glukoza (UDP-Glc) (Rys. 5) jest kluczowym związkiem, który pełni istotną rolę jako donor glikozyłu w licznych procesach biologicznych. Bierze udział w biosyntezie glikogenu, glikolipidów, proteoglikanów czy glikoprotein, a także w syntezie wielocukrów takich jak sacharoza, celuloza i kaloza. Ponadto stanowi prekursor innych cukrowych pochodnych UDP, np.: UDP-galaktozy oraz kwasu UDP-glukuronowego. UDP-glukoza odgrywa również istotną rolę w kontroli nowo zsyntetyzowanych glikoprotein w retikulum endoplazmatycznym [68,69].



Rys. 5. Wzór strukturalny urydyno-5'-difosfoglukozy.

Synteza UDP-Glc odbywa się z udziałem trzech enzymów: heksokinazy (HK), katalizującej przemianę glukozy w glukozo-6-fosforan; fosfoglukomutazy (Pgm), przekształcającej glukozo-6-fosforan w glukozo-1-fosforan; pirofosforylasy UDP-glukozy (UDPG), która katalizuje otrzymywanie UDP-Glc z glukozo-1-fosforanu oraz UTP (Schemat 5) [68,70].

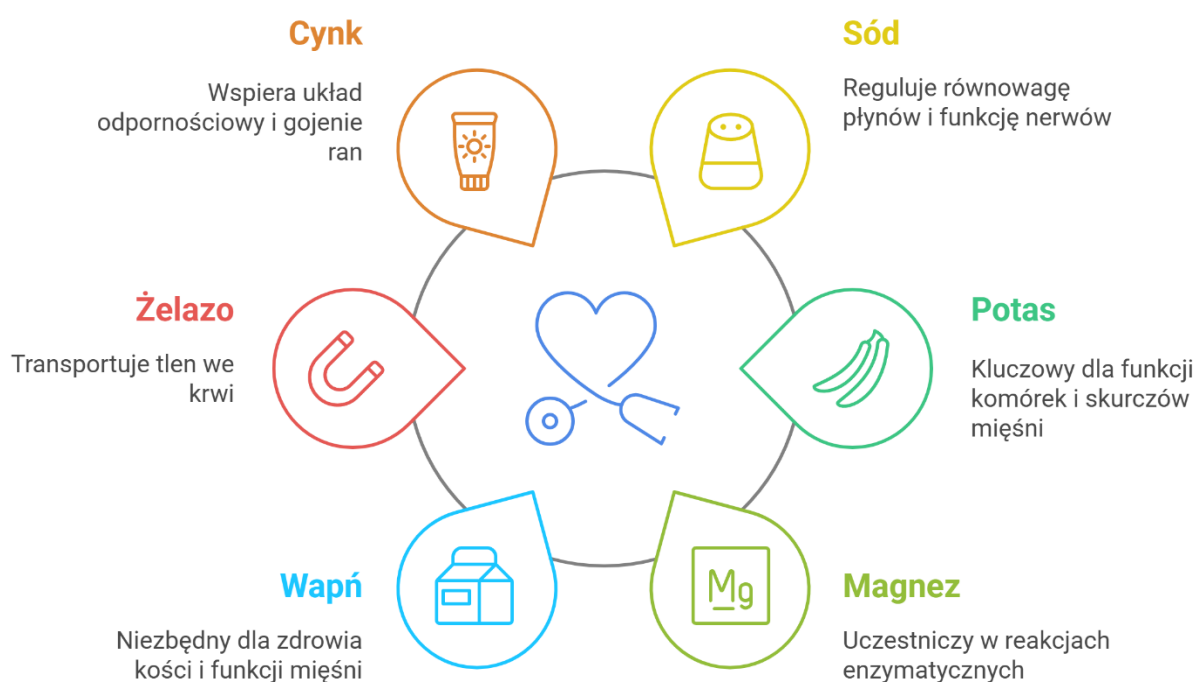


Schemat 5. Etapy syntezy UDP-Glc w obecności odpowiednich enzymów [67,69].

Analogicznie jak w przypadku UDP-GlcNAc, podwyższone stężenie UDP-Glc zaobserwowano u pacjentów z rakiem piersi [62]. Zwiększona aktywność pirofosforazy UDPG została zaobserwowana w niektórych typach nowotworów, np.: w gruczolaku przewodów trzustkowych, co koreluje z gorszym rokowaniem oraz nasileniem progresji choroby [70]. Dodatkowo, wysoki poziom dehydrogenazy UGD, enzymu katalizującego konwersję UDP-Glc do UDP-GluA, jest związany z zaawansowanym stadium raka prostaty, płuc czy piersi [71]. Urydyno-5'-difosfoglukoza może również pełnić rolę zewnątrzcząsteczkowej cząsteczki sygnałowej, działając jako agonista receptorów P2Y₁₄, należących do rodziny receptorów sprzężonych z białkiem G. Receptory te mogą być również aktywowane przez inne cukrowe pochodne UDP, np.: UDP-galaktozę, kwas UDP-glukuronowy, a także UDP-N-acetyloglukozaminę. Ekspresję receptora P2Y₁₄ wykazano w płucach, sercu, grasicy, łożysku oraz mózgu i jelitach, co wskazuje na jego potencjalne znaczenie terapeutyczne w leczeniu bólu, chorób układu oddechowego, a także cukrzycy [34, 72,73].

3.3. Jony metali o znaczeniu biologicznym

Jony metali odgrywają kluczową rolę w prawidłowym funkcjonowaniu organizmu (Rys. 6) i klasyfikowane są jako makroelementy i mikroelementy, w zależności od zapotrzebowania organizmu. Do najważniejszych należą: sód, potas, magnez, wapń, żelazo, cynk, miedź, mangan, nikiel i kobalt. Wspomniane pierwiastki uczestniczą w szeregu procesów biologicznych, takich jak transport tlenu, aktywność enzymatyczna i integralność strukturalna biomolekuł. Przyczyniają się do prawidłowego funkcjonowania komórek nerwowych, mięśniowych, mózgu czy serca. Jony metali stanowią centra aktywne wielu enzymów i białek, w tym hemoglobiny i witaminy B₁₂. W medycynie wykorzystywane są m.in. jako środki kontrastowe w rezonansie magnetycznym (MRI) oraz jako składniki leków stosowanych w terapii chorób przewlekłych, takich jak reumatoidalne zapalenie stawów (np.: auranofin) czy nowotwory (np.: cisplatyna) [74-78].



Rys. 6. Rola wybranych jonów metali w organizmie człowieka.

Związki metali przejściowych takich jak: cynk, złoto oraz srebro wykazują właściwości przeciwdrobnoustrojowe oraz przeciwnowotworowe (Tabela 3) co warunkuje ich zastosowanie w leczeniu infekcji i chorób nowotworowych. Srebro oraz jego związki ze względu na swoje właściwości przeciwdrobnoustrojowe stosowane są w maściach do działania miejscowego na, m.in.: rany po oparzeniach [79].

Tabela 3. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe i przeciwnowotworowe wybranych metali bloku d [79-82].

Metal	Właściwości	Zastosowanie
Srebro	Przeciwdrobnoustrojowe: vibro cholera, <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Candida albicans</i> Przeciwnowotworowe	Maści i kremy antybakteryjne, Preparaty pielęgnacyjne z nanocząstkami srebra
Złoto	Przeciwdrobnoustrojowe: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Wypełnienia dentystyczne, Antybiotyki z nanocząstkami złota
Cynk	Przeciwdrobnoustrojowe: vibro cholera, <i>Escherichia coli</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> Przeciwnowotworowe	Balsamy i kremy przeciwsłoneczne, Dezodoranty, Płyny do płukania jamy ustnej,

Znaczącą rolę terapeutyczną odgrywają kompleksy metali, które w połączeniu z lekami wykazują zwiększoną skuteczność działania. Ich zastosowanie pozwala na:

- redukcję dawek terapeutycznych i związanych z tym działań niepożądanych,
- obniżenie kosztów leczenia,
- przeciwdziałanie rozwojowi oporności patogenów,
- zwiększenie aktywności biologicznej związków terapeutycznych.

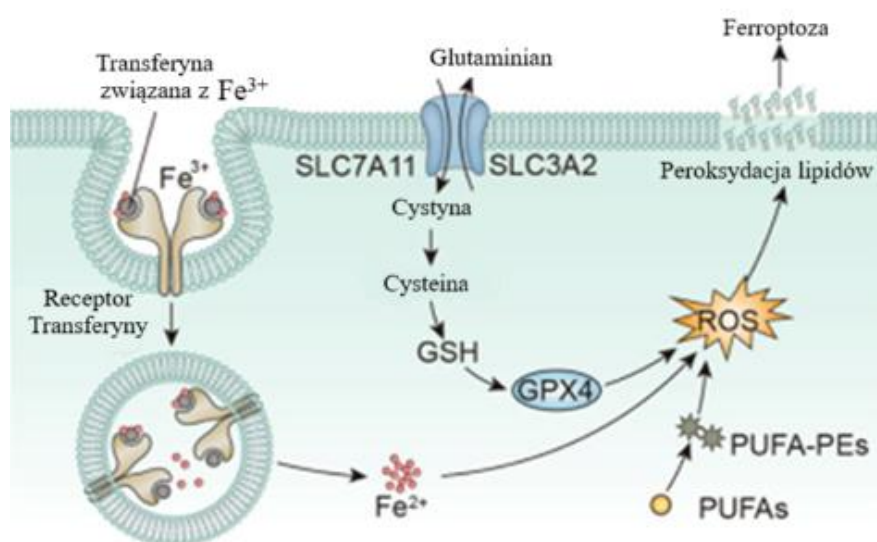
Związki kompleksowe metali charakteryzują się wyższą aktywnością przeciwdrobnoustrojową niż wolne ligandy. Skuteczność takich kompleksów wykazano wobec bakterii: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, a także grzybów: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger* i *Aspergillus fumigatus* [79].

Jony metali coraz częściej wykorzystywane są w diagnostyce oraz terapii chorób nowotworowych. Związki kompleksowe miedzi(II), kobaltu(II), czy manganu(II) z molekułami organicznymi wykazują właściwości przeciwnowotworowe wobec linii komórkowych raka płuc (A549), raka okrężnicy (HT29) oraz raka piersi (MCF-7). Metale bloku f, takie jak gadolin, wykorzystywane są jako środki kontrastujące w badaniach MRI [75,83]. Metale bloku d takie jak: żelazo, srebro, czy mangan cieszą się dużym zainteresowaniem naukowców, z uwagi na indukowanie śmierci komórek (Tabela 4) [81].

Tabela 4. Mechanizmy indukowania śmierci komórek nowotworowych przez wybrane jony metali [81].

Jony metalu	Mechanizm indukowania śmierci komórki	Zasada działania
$\text{Fe}^{2+}, \text{Fe}^{3+}$	Ferroptoza Apoptoza	Peroksydacja lipidów Biokataliza
Mn^{2+}	Apoptoza	Biokataliza Aktywacja układu odpornościowego
Ag^+	Apoptoza i autofagia	Biokataliza
Zn^{2+}	Apoptoza	Hamowanie procesu glikolizy
Ca^{2+}	Kalcykoptoza	Nadmierne obciążenie jonami wapnia
Na^+	Piroptoza	Zakłócenia ciśnienia osmotycznego
Ir^{3+}	Apoptoza i autofagia	Hamowanie cyklu komórkowego
Pt^{2+}	Apoptoza i autofagia	Hamowanie syntezy DNA
Mg^{2+}	Apoptoza	Aktywacja układu odpornościowego Promowanie sieciowania DNA

Szczególne zainteresowanie budzi mechanizm ferroptozy – programowanej śmierci komórki zależnej od obecności żelaza (Rys. 7). Ferroptoza polega na utlenianiu lipidów błon komórkowych i może być wykorzystywana w terapii nowotworów opornych na inne formy leczenia [81,84]. Innym nowo opisanym mechanizmem jest kuproptoza, czyli śmierć komórki indukowana przez jony miedzi. Proces ten zachodzi w wyniku zaburzeń w oddychaniu mitochondrialnym i stanowi alternatywę dla klasycznych mechanizmów, takich jak apoptoza, nekroptoza czy piroptoza [81].

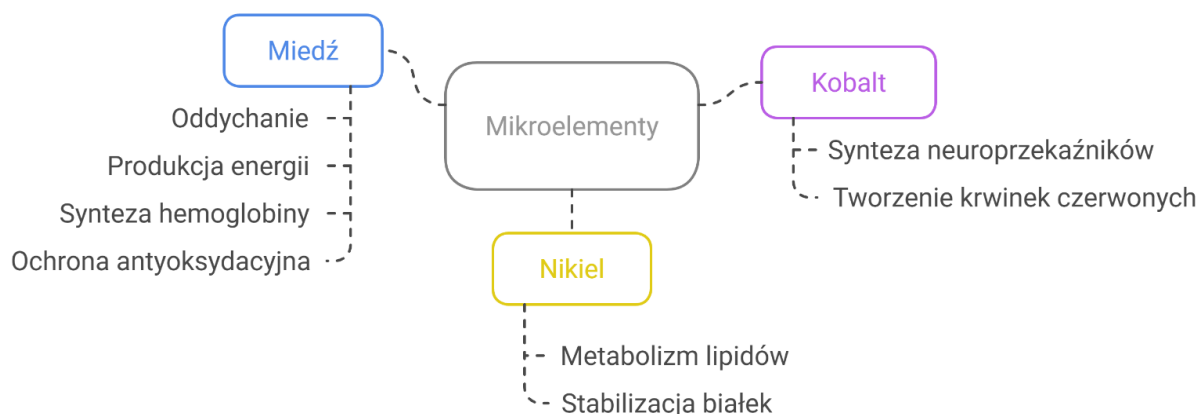


Rys. 7. Schematyczna ilustracja mechanizmu ferroptozy opartego na peroksydacji lipidów [81].

Zastosowanie jonów metali w terapii onkologicznej wiąże się z mniejszą toksycznością ogólnoustrojową w porównaniu z tradycyjnymi lekami przeciwnowotworowymi. Szczególnie obiecujące są nanocząsteczki oparte na metalach, których zdolność do selektywnej akumulacji w komórkach nowotworowych zwiększa skuteczność terapii celowanej. Ze względu na niską odporność komórek nowotworowych na jony metali, ich wykorzystanie w diagnostyce i leczeniu może znacząco poprawić efektywność terapii [81,85].

3.3.1. Metale bloku d – miedź, nikiel i kobalt

Jony metali, takie jak miedź (Cu), kobalt (Co) i nikiel (Ni), odgrywają kluczową rolę w wielu procesach biologicznych zachodzących w organizmach żywych (Rys. 8). Te mikroelementy są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka, a ich niedobór lub nadmiar może prowadzić do rozwoju poważnych zaburzeń fizjologicznych i chorób. Zrozumienie ich roli biologicznej, jak również potencjału terapeutycznego, jest istotne z punktu widzenia zdrowia publicznego oraz rozwoju terapii farmakologicznych.



Rys. 8. Rola mikroelementów w organizmie człowieka.

Jony miedzi(II) są niezbędne w podstawowych procesach komórkowych, takich jak oddychanie, produkcja energii, synteza hemoglobiny oraz ochrona antyoksydacyjna. Odpowiadają również za utrzymanie elastyczności naczyń krwionośnych i skóry [86-88]. Ponadto wspierają prawidłowe funkcjonowanie układów: odpornościowego, krwionośnego oraz nerwowego. Jony miedzi stanowi także centrum aktywne wielu enzymów i białek, takich jak oksydaza lizylowa, dysmutaza nadtlenkowa czy peroksydaza [88-90]. Jony miedzi(II) mogą być wykorzystywane w zwalczaniu takich patogenów jak: gronkowiec złocisty (*Staphylococcus aureus*), *escherichia coli* oraz bakterie legionelli, a także wykazują aktywność przeciwwirusową wobec wirusa grypy typu A [79].

Oksydaza lizylowa (LOX) (Rys. 9) to zewnątrzkomórkowy enzym wiążący jony miedzi(II), biorący udział w sieciowaniu kolagenu i elastyny w macierzy pozakomórkowej. Do rodziny oksydaz lizylowych (LOX) zaliczamy: LOX oraz LOX-Like (LOXL) 1-4. Enzymy te uczestniczą w regulacji transkrypcji, adhezji komórkowej oraz modulacji szlaków sygnalizacji komórkowej. Wzmoczona ekspresja LOX koreluje z patologiami serca, m.in. zwiększoną sztywnością mięśnia sercowego oraz niewydolnością lewej komory [91-94]. Obecność LOX w obrębie macierzy nowotworowej czyni go potencjalnym celem terapeutycznym, szczególnie ze względu na jego zdolność do akumulacji w guzie. Wysoka ekspresja LOX wiąże się

z niekorzystnym rokowaniem i u pacjentów z rakiem piersi, płuc prostaty, a także okrężnicy [92].



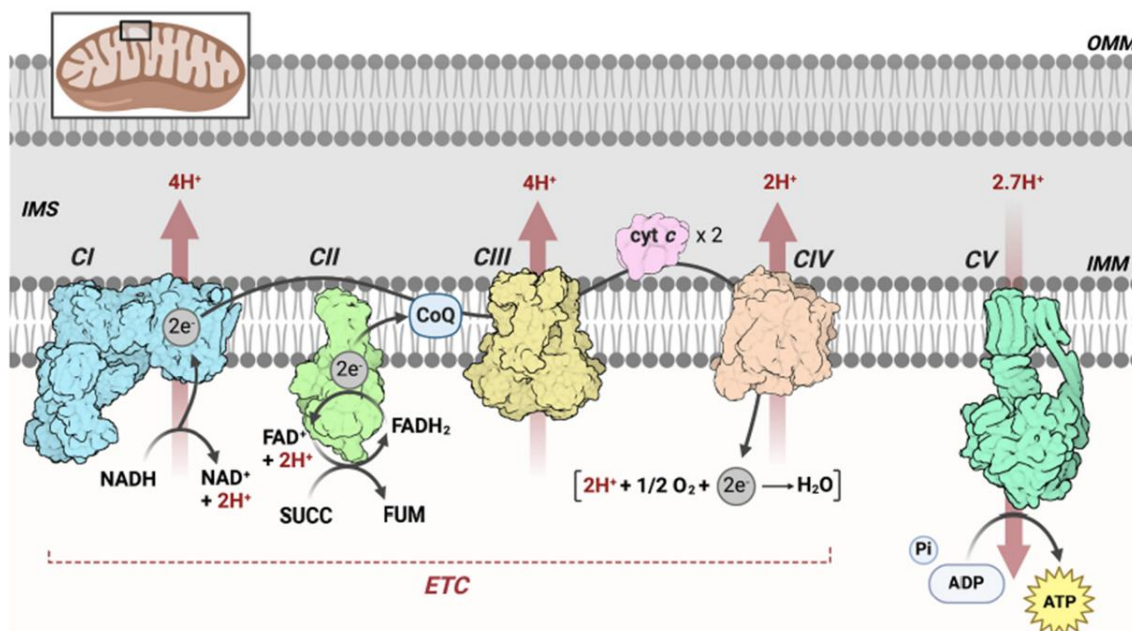
Rys. 9. Struktura krystaliczna ludzkiej oksydazy lizylowej 2 (hLOXL2) w stanie prekursorowym [95].

Do grupy enzymów zawierających jony miedzi(II) należy również dysmutaza ponadtlenkowa miedziowo-cynkowa (Cu, ZN-SOD) (Rys. 10). Do tej grupy enzymów zaliczamy również: SOD żelazowe (Fe-SOD), SOD magnezowe (Mg-SOD) oraz SOD niklowe (Ni-SOD). Enzymy te są szeroko rozpowszechnione w przyrodzie i odgrywają fundamentalną rolę w neutralizacji reaktywnych form tlenu (ROS). Katalizują one przekształcanie rodnika anionu ponadtlenkowego ($O_2^{\bullet-}$) do wolnego tlenu (O_2) oraz nadtlenu wodoru (H_2O_2) [96,97]. Enzymy SOD wykazują potencjał terapeutyczny jako środki przeciwzapalne oraz czynniki prewencyjne wobec zmian przednowotworowych [96,98]. Doniesienia literaturowe wskazują na istotny związek SOD z wieloma schorzeniami, m.in.: mukowiscydozą, stwardnieniem zanikowym bocznym, AIDS, apoptozą neuronów, a także chorobą nowotworową [96,99-101]. Dzięki właściwościom antyoksydacyjnym SOD stosowane są stosowane również w kosmetologii jako składniki przeciwstarzeniowe i ochronne, wspierające gojenie ran, redukujące blizny oraz chroniące przed promieniowaniem UV [96,102].



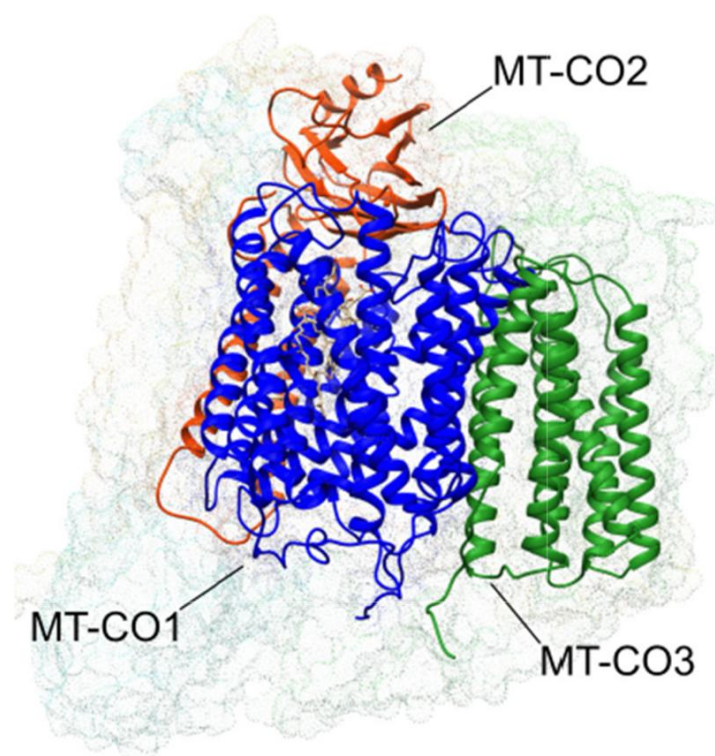
Rys. 10. Struktura krystaliczna Cu, Zn-SOD [103].

Kolejnym istotnym enzymem miedziowym jest oksydaza cytochromowa c (COX), będąca końcowym enzymem mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów (ETC) (Rys. 11). Enzym ten katalizuje utlenianie cytochromu c oraz redukcję tlenu cząsteczkowego (O_2) do wody (H_2O), co umożliwia transport protonów z macierzy mitochondrialnej do przestrzeni międzybłonowej (IMS) [104,105].



Rys. 11. Schematyczne przedstawienie procesu fosforylacji oksydacyjnej (OXPHOS). (ETC- łańcuch transportu elektronów, OMM- zewnętrzna błona mitochondrialna, IMM- wewnętrzna błona mitochondrialna, CoQ- koenzym Q, cyt c- cytochrom c) [104].

Enzym ten należy do oksydaz hemowo-miedziowych i zawiera dwie cząsteczki hemu oraz centra miedziowe: jednojądrowe (związane z MT-CO1) i dwujądrowe (związane z MT-CO2) (Rys. 12) [104,106].



Rys. 12. Organizacja strukturalna trzech enzymatycznych podjednostek rdzeniowych COX, MT-CO1, MT-CO2, MT-CO3 [104].

Niedobór oksydazy cytochromowej c (COX) to zaburzenie fosforylacji oksydacyjnej, prowadzące do upośledzenia biogenezy i funkcji enzymu. Zidentyfikowano cztery główne postaci niedoboru COX:

1. Łagodna dziecięca postać mitochondrialna, głównie wpływająca na mięśnie szkieletowe,
2. Śmiertelna dziecięca miopatia mitochondrialna z ciężką kwasicą metaboliczną,
3. Zespół Leigha – choroba OUN prowadząca do śmiertelnej encefalopatii,
4. Francusko-kanadyjski wariant zespołu Leigha, obejmujący mięśnie szkieletowe, mózg i wątrobę [104,107,108].

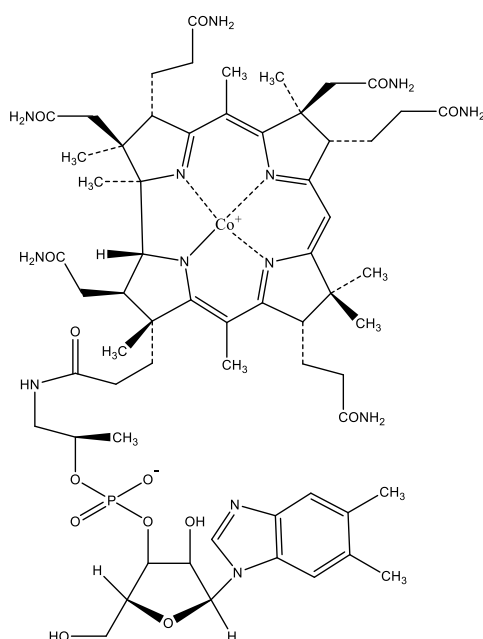
Dotychczas zidentyfikowano ponad 30 genów związanych z niedoborem COX, z których 13 koduje podjednostki mitochondrialnego łańcucha oddechowego [104,107,108]. Szczegółowe informacje dotyczące tych genów oraz ich konsekwencji klinicznych zestawiono w Tabeli 5.

Tabela 5. Lista genów związanych z niedoborem COX oraz ich konsekwencje kliniczne w organizmie człowieka [104].

Gen/Białko	Funkcja	Opisywane fenotypy kliniczne
MT-CO1	Podjednostka rdzenia katalitycznego 1	ataksja, hipotonia, padaczka
MT-CO2	Podjednostka rdzenia katalitycznego 2	zanik nerwu wzrokowego, ataksja, kardiomiopatia
MT-CO3	Podjednostka rdzenia katalitycznego 3	kwasica mleczanowa, encefalopatia, miopatia
TACO1	Aktywacja translacji MT-CO1	zespół Leigha, zanik nerwu wzrokowego, hipotonia
COX10	Biogeneza hemu A	kwasica mleczanowa, utrata słuchu, zespół Leigha
PET117	Nieznana	regresja neurorozwojowa, nietolerancja wysiłku fizycznego
COX20	Stabilizacja MT-CO2	opóźnienie wzrostu, hipotonia, ataksja mózdzkowa
SCO1	Biogeneza centrum CuA	choroby wątroby, przerost mięśnia sercowego
COX4I2	Podjednostka 4 izoforma 2	wrodzona zewnątrzwydzielnicza niewydolność trzustki
COX8A	Podjednostka 8A	nadciśnienie płucne, małopłowie, opóźnienie rozwoju

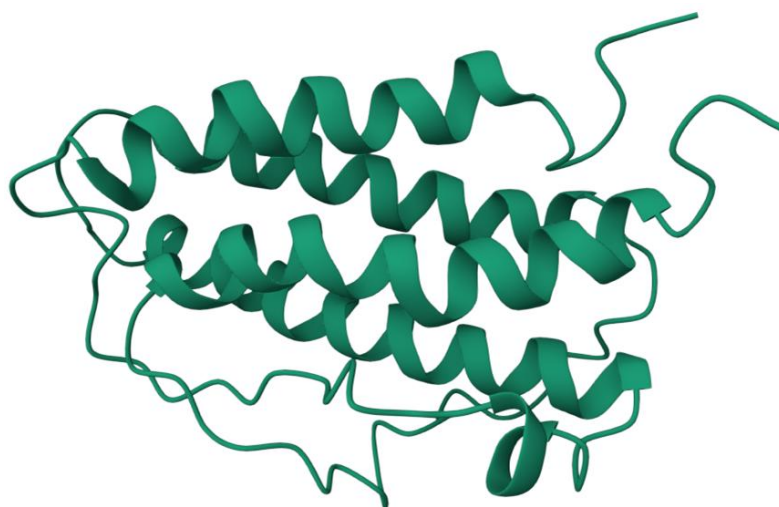
Jony kobaltu(II) stanowią główny składnik witaminy B₁₂ (Rys. 13) i odgrywają istotną rolę w syntezie aminokwasów i białek, a także są podstawowym koenzymem w procesach mitozy komórkowej. Ponadto są niezbędne w tworzeniu krwinek czerwonych (hematopoezie) oraz syntezie neuroprzekazników [109-112].

Witamina B₁₂ to koenzym zawierający jon Co²⁺ w centrum swojej struktury. Ponieważ człowiek nie jest w stanie samodzielnie jej syntetyzować, musi być ona dostarczana z pożywieniem, głównie w produktach pochodzenia zwierzęcego. Witamina B₁₂ pełni funkcję kofaktora, m.in.: w procesie syntezy metioniny, a jego odkrycie związane było z badaniami nad niedokrwistością złośliwą [113-115]. Jej niedobór może prowadzić do licznych zaburzeń hematologicznych, żołądkowo-jelitowych, neurologicznych i psychiatrycznych. Do objawów deficytu witaminy B₁₂ należą m.in.: zaburzenia pamięci, deficyt uwagi, demencja, zanik nerwu wzrokowego, zwiększenie średniej objętości krwinek, obrzęk kostek, dławica piersiowa oraz zastoinowa niewydolność serca [113].



Rys. 13. Wzór strukturalny Witaminy B₁₂ (kobalaminy).

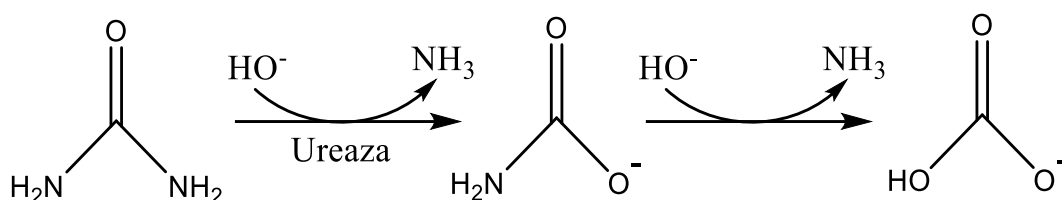
Sole kobaltu są również wykorzystywane w syntezie erytropoetyny (EPO) (Rys. 14), białka kluczowego dla powstawania erytrocytów w szpiku kostnym. Hormon ten zbudowany jest z czterech łańcuchów oligosacharydów oraz czternastu reszt kwasu sialowego [110, 116]. Po rozwoju płodowym głównym źródłem EPO jest wątroba, natomiast u dorosłych – nerki. Erytropoetyna działa za pośrednictwem receptora EPOR, który wykazuje preferencyjną ekspresję w komórkach śródbłonna naczyniowego oraz niektórych komórkach nowotworowych [117]. Badania wskazują, że EPO odgrywa istotną rolę w ochronie i regeneracji tkanek – w odpowiedzi na niedotlenienie, stan zapalny lub uraz wiele tkanek produkuje EPO lokalnie w miejscu uszkodzenia. Ponadto hormon ten oraz jego pochodne mogą bezpośrednio oddziaływać na komórki układu odpornościowego [118].



Rys. 14. Struktura ludzkiej erytropoetyny [119].

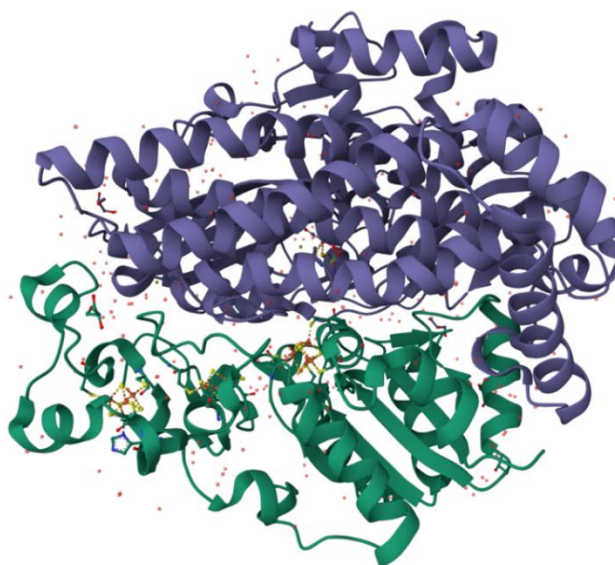
Jony niklu(II), podobnie jak jony kobaltu i miedzi, odgrywają istotne role w prawidłowym funkcjonowaniu organizmów żywych. Są one niezbędne do stabilizacji struktury biomolekuł, np.: białek oraz stanowią centra aktywne wielu enzymów uczestniczących w metabolizmie lipidów i białek. [120]. Do najważniejszych mikrobiologicznych enzymów zawierających jony niklu(II) zaliczamy: ureazę, hydrogenazę, dehydrogenazę CO oraz niklową dysmutazę ponadtlenkową [121].

Ureaza to enzym istotny w cyklu azotowym, obecny u bakterii, roślin i grzybów. Katalizuje ona hydrolizę mocznika do amoniaku i kwasu karbaminowego (Schemat 6) [121,122]. Jej centrum aktywne zawiera dwa jony Ni^{2+} połączone mostkiem utworzonym przez karbamylowaną resztę lizyny i cząsteczkę wody. Każdy jon Ni^{2+} jest dodatkowo koordynowany przez dwie reszty histydynowe, a jeden z nich również przez kwas asparaginowy [122].



Schemat 6. Enzymatyczna reakcja rozkładu mocznika [121].

Hydrogenaza katalizuje odwracalną redukcję protonu do cząsteczki wodoru. Enzym ten występuje zarówno u bakterii, jak i eukariontów. [NiFe]-hydrogenazy (Rys. 15) składają się zwykle z co najmniej dwóch podjednostek: dużej podjednostki katalitycznej zawierającej miejsce aktywne NiFe oraz małej podjednostki odpowiedzialnej za transfer elektronów, zawierającej jeden lub więcej klastrów żelazowo-siarkowych (Fe-S) [122,123].



Rys. 15. Struktura nieutlenionej formy [NiFe]-hydrogenazy [124].

Zaburzenia stężenia mikroelementów takich jak: jony miedzi(II), jony kobaltu(II) oraz jony niklu(II), mogą prowadzić na pełnione przez te jony funkcje w organizmach żywych, co skutkuje występowaniem zmian patologicznych oraz chorób (Tabela 6).

Tabela 6. Przykłady schorzeń i chorób związanych z zaburzeniami stężenia jonów miedzi(II), kobaltu(II) oraz niklu(II) w organizmie człowieka [37,88,90,109,110,120].

Jon metalu	Przykłady schorzeń lub chorób
Cu^{2+}	choroby tarczycy, choroby kości i stawów, anemia, tętniaki, zespół Menkesa, choroba Parkinsona, choroba Alzheimera, choroba Wilsona, białaczka
Co^{2+}	Anemia, choroby tarczycy, astma, nadprodukcja erytrocytów, zwłóknienie płuc
Ni^{2+}	uszkodzenie nerek i wątroby, zmiany w strukturze DNA, choroby dermatologiczne, zaburzenia metabolizmu lipidów i białek, nowotwór dróg oddechowych

Ze względu na swoje właściwości biologiczne, jony te cieszą się dużym zainteresowaniem jako składniki potencjalnych leków, m.in.: przeciwnowotworowych. Związki kompleksowe jonów Co^{2+} i Ni^{2+} z lidokainą wykazują zwiększoną cytotoksyczność względem wybranych linii komórek nowotworowych, a także wykazują właściwości przeciwdrobnoustrojowe względem takich patogenów jak: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus anthracis*, czy *Streptococcus pyogenes* [125]. Dodatkowo, podobnie jak inne jony metali, jony miedzi(II), kobaltu(II) i niklu(II) mogą indukować apoptozę komórek. Związki niklu wykazują zdolność do wywoływania apoptozy m.in. w komórkach raka piersi (MCF-7), komórkach skóry, komórkach wątroby (HepG2), a także w neutrofilach [81,112,126].

3.4. Charakterystyka metod badawczych

3.4.1. Miareczkowanie potencjometryczne

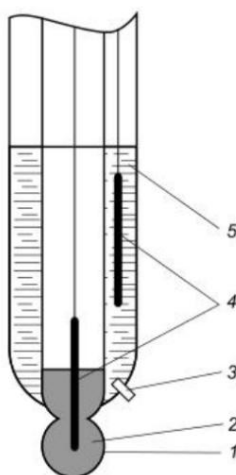
Jednymi z najstarszych metod wykorzystywanych w analizie chemicznej są metody potencjometryczne, do których – oprócz miareczkowania potencjometrycznego – zaliczamy również pH-metrię oraz potencjometrię bezpośrednią. Techniki te opierają się na pomiarze siły elektromotorycznej (SEM) ogniwa, będącego układem dwóch elektrod zanurzonych w analizowanym roztworze. Jednym z pierwszych historycznych przykładów takiego układu jest ogniwo Daniella, zbudowane z półogniwa miedzanego i cynkowego, zanurzonych w roztworach swoich soli. Podstawą działania metody jest zmiana potencjału elektrod, na którą wpływają procesy elektrodowe oraz aktywność jonów obecnych w analizowanym roztworze [127].

Ze względu na sposób działania elektrody dzieli się na:

- **Elektrody I rodzaju** – odwracalne względem kationu (np. elektroda wodorowa),
- **Elektrody II rodzaju** – odwracalne względem wspólnego anionu (np. elektroda kalomelowa, elektroda chlorosrebrowa),
- **Elektrody III rodzaju** – odwracalne względem wspólnego kationu,
- **Elektrody utleniająco-redukujące** – chemicznie obojętny metal zanurzony w roztworze zawierającym jony w różnych stanach utlenienia (np. elektroda chinhydrynowa) [127].

Ze względu na pełnioną funkcję analityczną wyróżniamy:

- **Elektrody wskaźnikowe**, których potencjał zmienia się w odpowiedzi na obecność specyficznych jonów w roztworze. Ich potencjał zależy od aktywności analizowanych jonów w roztworze. Do elektrod wskaźnikowych zaliczamy m.in. jonoselektywne elektrody membranowe, w tym elektrody szklane. Specyficznym rodzajem elektrody szklanej jest elektroda szklana kombinowana, która zawiera w jednym korpusie elektrodę wskaźnikową (elektrodę szklaną) oraz elektrodę odniesienia (elektrodę chlorosrebrową) (Rys. 16).
- **Elektrody porównawcze** (odniesienia), które cechują się stabilnym, niezależnym od stężenia roztworu potencjałem. Pomiar oparty jest na porównaniu potencjału elektrody wskaźnikowej i elektrody odniesienia. Przykładem są elektrody II rodzaju: chlorosrebrowa i kalomelowa – reagujące na obecność jonów chlorkowych w roztworze [127].



Rys. 16. Budowa elektrody szklanej kombinowanej: 1-membrana elektrody szklanej, 2-roztwór wewnętrzny elektrody szklanej, 3-połączenie elektrolityczne elektrody porównawczej, 4-elektrody chlorosrebrowe, 5-roztwór wewnętrzny elektrody odniesienia [127].

Jednym z głównych zastosowań metody potencjometrycznej jest miareczkowanie potencjometryczne. Metoda ta polega na pomiarze siły elektromotorycznej ogniwa po dodaniu każdej porcji odczynnika miareczkującego (titranta). W początkowej fazie miareczkowania zmiany stężenia są niewielkie, a SEM zmienia się w nieznacznym stopniu. W punkcie równoważnikowym (końcowym) obserwuje się gwałtowny skok wartości SEM, wynikający z nagłego spadku stężenia jonów analitu. Na podstawie otrzymanych danych sporządza się krzywą miareczkowania, przedstawiającą zależność SEM [mV] od objętości dodawanego titranta [cm^3]. Punkt końcowy miareczkowania można wyznaczyć metodami graficznymi, pierwszej lub drugiej pochodnej, bądź przy użyciu metod numerycznych [127].

Metody potencjometryczne z wykorzystaniem jonoselektywnych elektrod membranowych znajdują zastosowanie w:

- **pH-metrii** – do precyzyjnego oznaczania pH w laboratoriach przemysłowych, klinicznych i analitycznych
- **analizie anionów** (np. F^- , Cl^- , CN^-) – w wodzie pitnej, ściekach, glebie oraz materiałach biologicznych,
- **oznaczaniu stężenia kationów** (np. Na^+ , Ca^{2+} oraz NH_4^+) – w płynach ustrojowych,
- **oznaczaniu substancji biologicznie czynnych**, np.: leków na bazie alkaloidów [127].

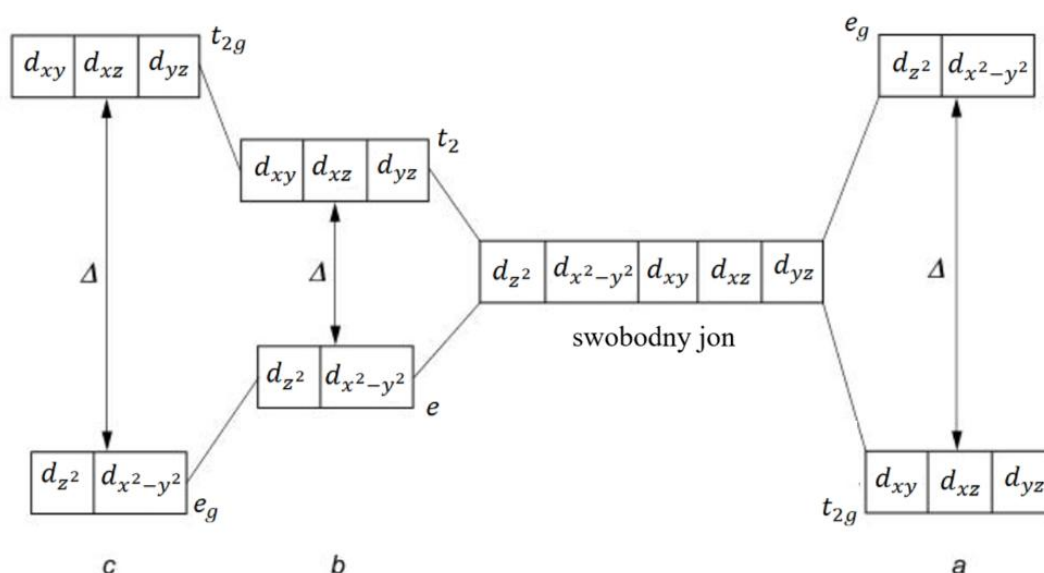
3.4.2. Spektroskopia UV-Vis

Spektroskopia UV-Vis to jedna z najstarszych metod i najbardziej rozpowszechnionych stosowanych w analizie chemicznej. Zaliczana jest do metod instrumentalnych, a przedmiotem jej badań są widma elektronowe. Widma te, szczególnie w przypadku kompleksów metali przejściowych, związane są z przejściami elektronów d-d [127,128].

Metale i jony metali bloku *d* posiadają pięć równocennych energetycznie orbitali, które mogą ulegać rozszczepieniu w polu liganda. W polu liganda ulegają one rozszczepieniu na dwie grupy orbitalne (Schemat 7), różniące się energią. W geometrii tetraedrycznej lub oktaedrycznej wyróżnia się:

- **Grupę I:** orbitale d_{z^2} oraz $d_{x^2-y^2}$,
- **Grupę II:** orbitale d_{xy} , d_{xz} i d_{yz} .

Różnica energii między rozszczepionymi poziomami zależy od geometrii powstających związków kompleksowych, a także od rodzaju i siły ligandów [127].



Schemat 7. Rozszczepienie orbitali d w polu o symetrii oktaedrycznej (a), tetraedrycznej (b) oraz regularnej (c) [127].

W związkach kompleksowych metali przejściowych mogą występować przejścia *d-d*, w których elektron z orbitalu o niższej energii zostaje przeniesiony na orbital o energii wyższej, pochłaniając przy tym foton o długości fali λ odpowiadającej różnicy energii między tymi orbitalami. Przejścia te są odpowiedzialne za charakterystyczne barwy związków metali bloku *d*, np.: miedzi, chromu, niklu czy kobaltu [127].

Badania spektroskopowe UV-Vis przeprowadzane są z wykorzystaniem spektrofotometrów UV-Vis, których podstawowe elementy to:

- **Źródło promieniowania:** np. lampa deuterowa lub wysokociśnieniowa lampa ksenonowa,
- **Monochromator:** składający się ze szczelin (wejściowej i wyjściowej), kolimatora oraz siatki dyfrakcyjnej rozpraszającej wiązkę światła,
- **Miejsce na kuwetę pomiarową:** wykonana z materiałów optycznych takich jak kwarc, szkło optyczne czy stopiona krzemionka,
- **Detektor:** np. fotodioda, fotopowielacz lub fotokomórka,
- **Układ wzmacniający i rejestrujący:** , komputer z oprogramowaniem, który przetwarza i wyświetla wyniki [127,128,129].

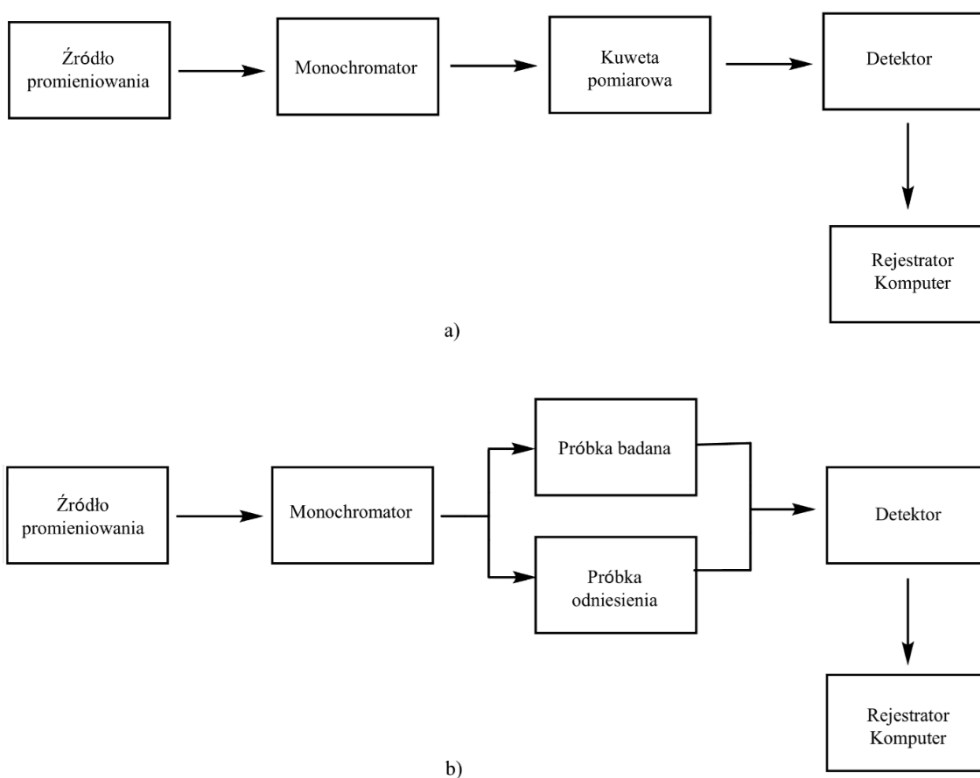
Spektrofotometry UV-Vis można podzielić ze względu na:

a) Sposób rejestracji widma:

- **Spektrofotometry samorejestrujące** – rejestrują widma w postaci wykresów $A = f(\lambda)$, $\%T = f(\lambda)$ lub $\epsilon = f(\lambda)$
- **Spektrofotometry punktowe** – działające w trybie kompensacyjnym lub wychyleniowym.

b) Budowę:

- **Spektrofotometry jednowiązkowe** (Schemat 8a) – wiązka promieniowania przechodzi kolejno przez roztwór odniesienia, a następnie przez analizowaną próbkę,
- **Spektrofotometry dwuwiązkowe** (Schemat 8b) – wiązka jest dzielona na dwie części: jedna przechodzi przez próbkę, druga przez roztwór odniesienia [127,128].



Schemat 8. Schemat blokowy budowy spektrometru UV-Vis: (a) jednowiązkowego, (b) dwuwiaźkowego.

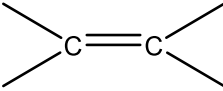
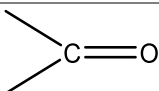
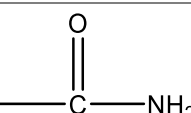
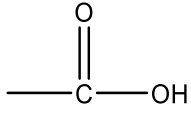
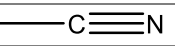
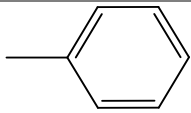
Podstawą analizy spektroskopowej UV-Vis jest pomiar wartości absorbancji A badanej próbki przy określonej długości fali λ . Nowoczesne spektrofotometry umożliwiają jednoczesny pomiar absorbancji w szerokim zakresie fal, tworząc pełne widmo [127,128]. Spektroskopia UV-Vis wykorzystywana jest do analizy związków absorbujących promieniowanie w zakresie ultrafioletowym i widzialnym, m.in.:

- Bezbarwnych substancji organicznych i nieorganicznych, absorbujących promieniowanie w zakresie bliskiego nadfioletu, np.: krzemionki, ozonu, aldehydów, ketonów oraz węglowodorów aromatycznych,
- Związków powstających w wyniku reakcji chemicznych, np.: związki kompleksowe kationów metali,
- Barwników organicznych oraz barwnych soli metali, absorbujących promieniowanie w zakresie widzialnym [127].

W analizie jakościowej spektroskopia UV-Vis pozwala na identyfikację obecnych w próbce grup funkcyjnych (chromoforów), czyli atomów lub grup atomów absorbujących promieniowanie w określonym zakresie długości fali (Tabela 7). Obecność grup chromoforowych wpływa na maksimum absorpcji wywołując:

- **Przesunięcie batochromowe** – maksimum absorpcji przesuwają się w kierunku fal dłuższych,
- **Przesunięcie hipsochromowe** – maksimum absorpcji przesuwają się w kierunku fal krótszych,
- **Efekt hiperchromowy** – wzrost absorpcji promieniowania,
- **Efekt hipochromowy** – spadek absorpcji promieniowania [127,128,129].

Tabela 7. Przykładowe typy chromoforów [127,129].

Chromofor	Przykład związku	λ_{max} [nm]
	etylen	165
	aceton	166 189 279
	acetamid	178 220
	kwas octowy	204
	acetonitryl	167
	benzen	184 204 254

Ponadto spektroskopia UV-Vis znalazła zastosowanie w analizie ilościowej do oznaczania anionów nieorganicznych, takich jak: F^- , NO_3^- , NO_2^- , PO_4^{3-} , SiO_3^{2-} , a także do oznaczania kationów metali, m.in.: Fe^{3+} , Co^{3+} , Pd^{2+} , Bi^{3+} oraz Mo^{6+} . Metoda ta wykorzystywana jest także do badania równowag reakcji chemicznych, w tym do wyznaczania stałych trwałości związków kompleksowych [127].

3.4.3. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)

Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) to dział spektroskopii jądrowej, wykorzystujący właściwości magnetyczne jąder atomowych pierwiastków chemicznych. Metoda ta znajduje szerokie zastosowanie przede wszystkim w identyfikacji i badania struktury związków organicznych [127,128].

Jądro atomowe, jako cząstka posiadająca ładunek elektryczny, wykazuje również własny moment pędu, zwanym spinem jądrowym. Spinowy moment pędu jądra wyrażany jest wzorem:

$$M_I = \sqrt{I(I + 1)} \frac{h}{2\pi} \quad (1)$$

gdzie: M_I – moment pędu jądra, I – liczba kwantowa spinu jądrowego, h – stała Plancka [127,128].

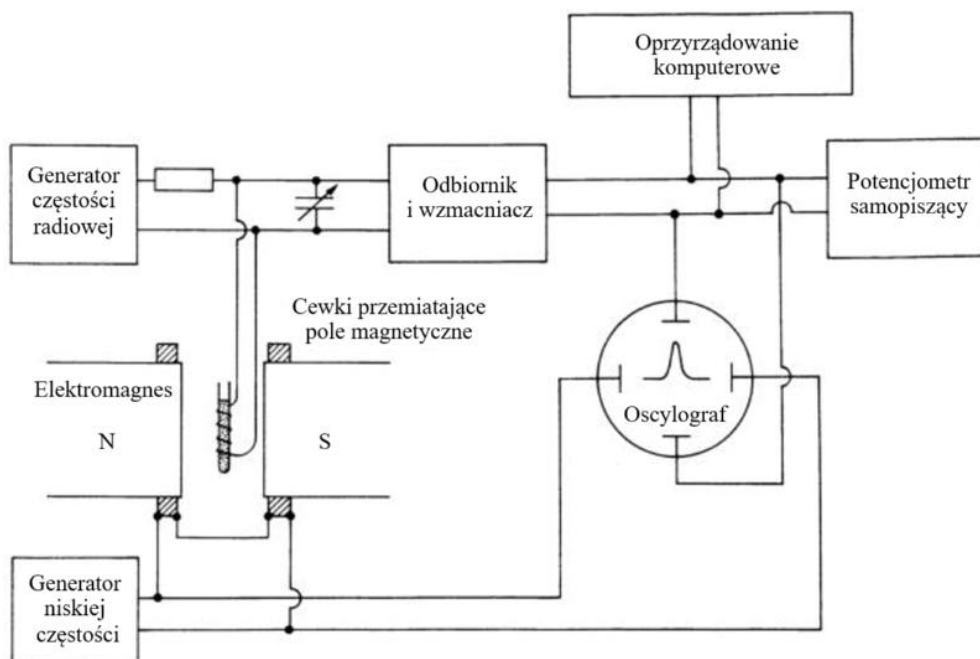
Spin jądrowy jest wynikiem wektorowej sumy spinów wszystkich cząstek elementarnych tworzących dane jądro atomowe. Liczba kwantowa spinu jądrowego przyjmuje wartości od 0 do 9/2. Wartości magnetyczne wybranych jąder atomowych zestawiono w Tabeli 8 [127,128].

Tabela 8. Właściwości magnetyczne wybranych jąder atomowych [127].

Izotop	Liczba spinowa I
^1H	1/2
^2H	1
^{12}C	0
^{13}C	1/2
^{16}O	0
^{32}S	0
^{35}Cl	3/2
^{19}F	1/2

Aparatura (Schemat 9) do badań magnetycznego rezonansu jądrowego składa się z następujących elementów:

- **Źródła jednorodnego pola magnetycznego**, którym może być elektromagnes, magnes stały lub elektromagnes nadprzewodnikowy,
- **Generator promieniowania o częstotliwości radiowej (RF)**,
- **Sonda z próbką** umieszczona w polu magnetycznym,
- **Urządzenie do przemiatania widma**,
- **Detektor i wzmacniacz**,
- **Rejestrator oraz komputer** służące do obróbki i wizualizacji danych,
- **Oscylograf**,
- **Potencjometr samopiszący** [127].



Schemat 9. Budowa spektrometru NMR [127].

Badania przeprowadza się dla roztworów, przygotowanych w odpowiednim rozpuszczalniku, np.: D_2O , CCl_4 , CS_2 lub $CDCl_3$. Pomiar próbki przeprowadza się względem odpowiedniej substancji wzorcowej, m.in.: dioksanu lub tetrametylosilanu [127]. Jednym z podstawowych parametrów analizowanych w spektroskopii NMR jest przesunięcie chemiczne (δ), będące różnicą położenia sygnału próbki względem wzorca. Oprócz przesunięcia chemicznego charakterystycznym elementem widma NMR są również powierzchnia sygnału oraz sprzężenie spinowo-spinowe [127,128,129].

Badania spektroskopowe NMR przeprowadza się najczęściej dla izotopów: 1H , ^{13}C , ^{11}B , ^{14}N , ^{31}P , ^{28}Si oraz ^{19}F . Analiza ta wykorzystywana jest głównie do identyfikacji i badania struktury związków chemicznych [127,128]. Spektroskopia NMR wykorzystywana jest głównie do:

- **Identyfikacji związków chemicznych** i określenia ich struktury,
- **Analizy rozmieszczenia atomów** w cząsteczce (analiza konformacyjna i stereochemiczna),
- **Wyznaczania zawartości ilościowej** badanej substancji w próbce [127].

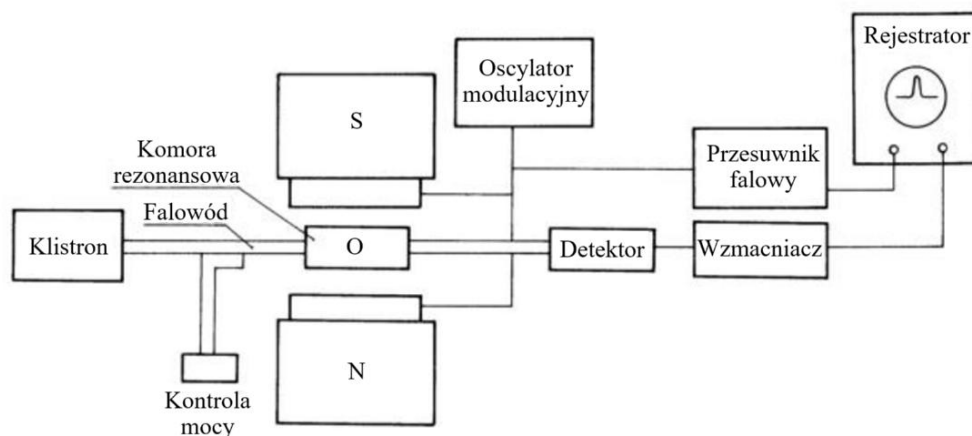
3.4.4. Spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR)

Spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) wykorzystywana jest dla analizy substancji paramagnetycznych, czyli takich, które posiadają niesparowane elektrony. Jest to technika spektroskopii atomowej, w której absorpcja promieniowania zachodzi w obecności zewnętrznego pola magnetycznego. Mechanizm działania spektroskopii EPR jest analogiczny do spektroskopii NMR, z tą różnicą, że dotyczy elektronów zamiast jąder atomowych. Orientacja jednego niesparowanego elektronu w polu magnetycznym może być równoległa ($m_s = \frac{1}{2}$) lub anty równoległa ($m_s = -\frac{1}{2}$), co odpowiada różnym poziomom energetycznym [128].

Ze względu na większy moment magnetyczny elektronu w porównaniu z protonem oraz jego mniejszą masę, w spektroskopii EPR stosuje się znacznie słabsze pole magnetyczne niż w spektroskopii NMR.

Analiza próbek odbywa się z wykorzystaniem spektrometru EPR (Schemat 10), a w skład aparatury wchodzi:

- **Klinstron** – źródło promieniowania mikrofalowego,
- **Falowody** – przewody doprowadzające fale do komory rezonansowej,
- **Komora rezonansowa** – umieszczona pomiędzy biegunami elektromagnesu,
- **Detektor** – rejestrujący sygnał absorpcji,
- **Wzmacniacz** – rejestrujący sygnał absorpcji,
- **Rejestrator** – odpowiedzialny za obróbkę oraz prezentację danych.



Schemat 10. Schemat blokowy spektrometru EPR [128].

Widmo EPR przedstawia wykres zależności wartości intensywności od natężenia pola magnetycznego, rzędu 0,1-10 mT. Rejestracja widma odbywa się poprzez umieszczenie próbki

między biegunami silnego elektromagnesu, stosując stałą częstotliwość promieniowania elektromagnetycznego i zmienne natężenie pola magnetycznego [128]. Kształt uzyskanego widma jest charakterystyczny dla danego jonu metalu, z uwagi na jego oddziaływanie nie tylko z zewnętrznym polem magnetycznym, ale również polem magnetycznym wytwarzanym przez otoczenie substancji. Podobnie jak w spektrometrii NMR, w analizie EPR stosowane są substancje wzorcowe, m.in.: etylenodiamina (en) lub 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazal (DPPH) [128].

Elektronowy rezonans paramagnetyczny wykorzystywany jest do badań substancji paramagnetycznych tj.: jony metali bloku d i f lub wolne rodniki. Metoda ta umożliwia również badanie nietrwałych związków w niskich temperaturach, np.: temperaturze wrzenia ciekłego azotu -196°C (77K). Zamrażanie próbek wykorzystywane jest w badaniach kinetyki reakcji chemicznych. Do substancji badanych za pomocą spektroskopii EPR zaliczamy:

- Polimery syntetyczne,
- Kauczuki,
- Katalizatory,
- Związki kompleksowe metali przejściowych i ziem rzadkich.

Metoda ta znajduje coraz szersze zastosowanie w analizie układów biologicznych. Do układów niebędących paramagnetykami wprowadza się sondy spinowe (np.: rodniki) umożliwiające przeprowadzenie pomiaru [128].

3.4.5. Spektroskopia dichroizmu kołowego (CD)

Spektroskopia dichroizmu kołowego (CD) jest techniką analityczną umożliwiającą analizowanie struktur chiralnych, głównie cząsteczek biologicznych, takich jak białka błonowe. Metoda ta znajduje zastosowanie m.in. w analizie struktur drugorzędowych, ścieżek fałdowania i stabilności białek, oddziaływań międzycząsteczkowych i wiązania ligandów, a także wykorzystana została w badaniach zaburzeń białek. Spektroskopia CD stanowi uzupełnienie informacji uzyskiwanych przy pomocy innych metod spektroskopowych, takich jak spektroskopii NMR [130-132].

Podstawą techniki CD jest absorpcja prawoskrętnego i lewoskrętnego światła spolaryzowanego kołowo przez cząsteczkę chiralną. Chiralność układu powoduje, że światło spolaryzowane w różnych kierunkach jest pochłaniane w odmiennym stopniu, co prowadzi do powstania eliptycznie spolaryzowanej fali świetlnej. Zjawisko to opisuje wzór:

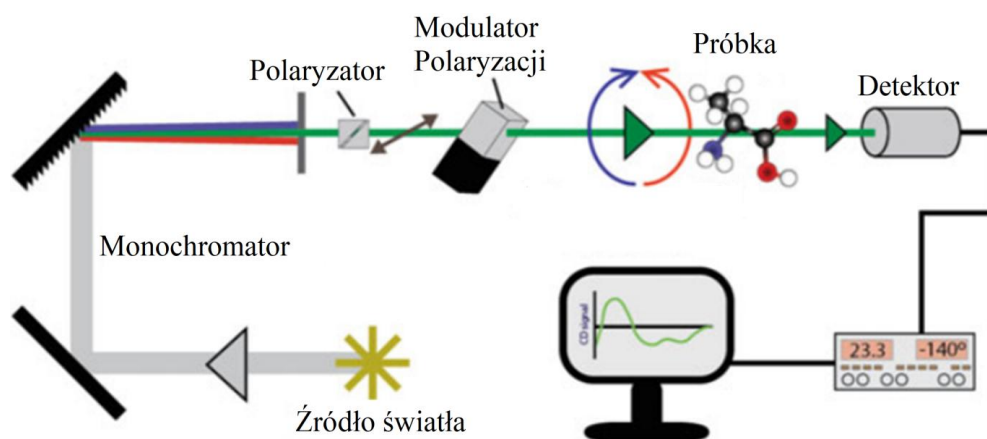
$$\emptyset = \frac{\pi}{\lambda(\eta_l - \eta_r)} \quad (2)$$

gdzie: $\emptyset$ - eliptyczność (w radianach) powstającej fali świetlnej, η_l i η_r - współczynniki absorpcji światła spolaryzowanego kołowo lewo- i prawoskrętnie o długości fali λ [132, 133].

Gdy przez próbkę biologiczną przechodzi spolaryzowane światło, różnice w absorpcji wynikające z chiralności struktury molekularnej powodują powstanie charakterystycznego widma dichroizmu kołowego, zawierającego piki dodatnie i ujemne. W przypadku białek, sygnały CD występują głównie w dalekim zakresie nadfioletu (UV) (180–250 nm), co jest związane z obecnością wiązania peptydowego. W tym zakresie można identyfikować i analizować strukturę drugorzędową białek. Za główne przejścia elektronowe odpowiedzialne za sygnały CD uznaje się: przejście n - p* przy około 222 nm oraz przejścia p - p* (zarówno w orientacji równoległej, jak i prostopadłej) przy około 240 i 190 nm. [130,132]. Zmiany wynikające z absorpcji światła przez zasadę urydynową obserwowane są w zakresie długości fali 250-280 nm [37].

Typowy spektropolarometr CD (Schemat 11) składa się z następujących elementów:

- **Źródła światła UV** (najczęściej lampa deuterowa),
- **Monochromator** – wybór długości fali,
- **Polaryzator** – wytwarzający liniowo spolaryzowane światło,
- **Modulator polaryzacji** – zamieniający liniową polaryzację na kołową,
- **Komora pomiarowa z próbką**,
- **Detektor** – mierzący różnicę w absorpcji promieniowania [134].



Schemat 11. Schematyczne przedstawienie układu optycznego typowego spektrometru CD [134].

3.4.6. Badania biologiczne – badania MTT

Testy biologiczne oparte na hodowlach komórek (in vitro) coraz częściej wykorzystywane do oceny cytotoksyczności substancji i stanowią istotne uzupełnienie tradycyjnych metod chemicznych. Współcześnie stanowią również one alternatywę dla testów prowadzonych na zwierzętach [135]. Cytotoksyczność jest jedną z podstawowych właściwości ocenianych w kontekście potencjalnej toksyczności nowych związków. W tym celu wykorzystuje się różne metody badające wpływ substancji na procesy fizjologiczne zachodzące w komórkach. Testy biologiczne umożliwiają m.in.:

- Pomiar liczby żywych lub martwych komórek,
- Oznaczenie aktywności enzymów związanych z metabolizmem komórkowym,
- Określenie zdolności komórek do podziału [135,136].

Testy cytotoksyczności, ze względu na zastosowaną metodę można podzielić na dwie główne grupy.

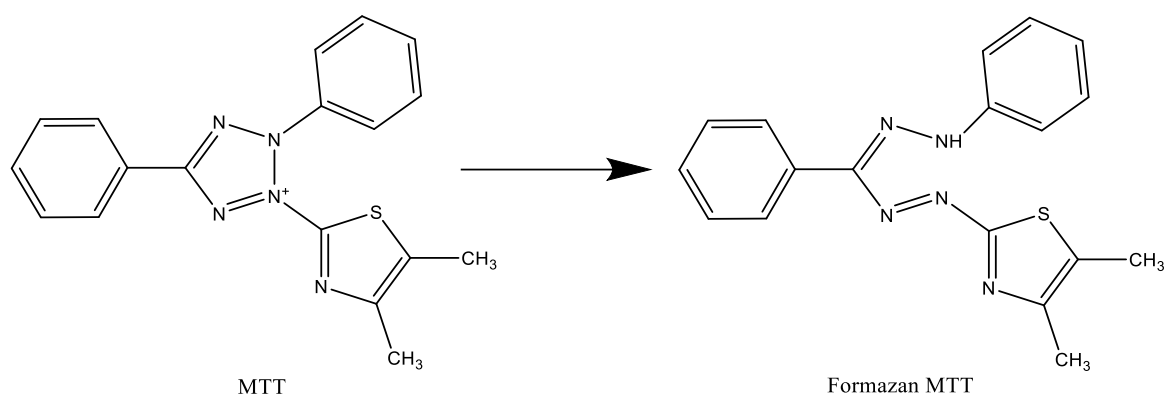
a) **Grupa I** – testy oparte na pomiarze całkowitej zawartości białka w komórkach:

- Test **Kenacid Blue**
- Barwienie **sulforhodaminą B**

b) **Grupa II** – testy oparte na aktywności metabolicznej komórek:

- Test **Alamar Blue**
- Test **MTT** (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylotetrazoliowy)
- Test **XTT** (2,3-bis-(2-metoksy-4-nitro-5-sulfenilo)-(2H)-tetrazol-5-karboksanilid) [135]

Jedną z najczęściej stosowanych metod oceny aktywności komórek jest test MTT. Metoda ta oparta jest na redukcji odczynnika MTT (żółty barwnik) do nierozpuszczalnego w wodzie niebieskiego formazanu (Schemat 12). Zdrowe i szybko rozwijające się komórki wykazują wysokie tempo redukcji MTT do formazanu, w przeciwieństwie do komórek martwych lub nieaktywnych. Istnieje liniowa zależność między wytwarzaną barwą, a liczbą komórek aktywnych metabolicznie. Metoda ta wykorzystywana jest m.in.: do oceny żywotności komórek oraz cytotoksyczności w badaniach przesiewowych nowych leków [37,135,137,138].

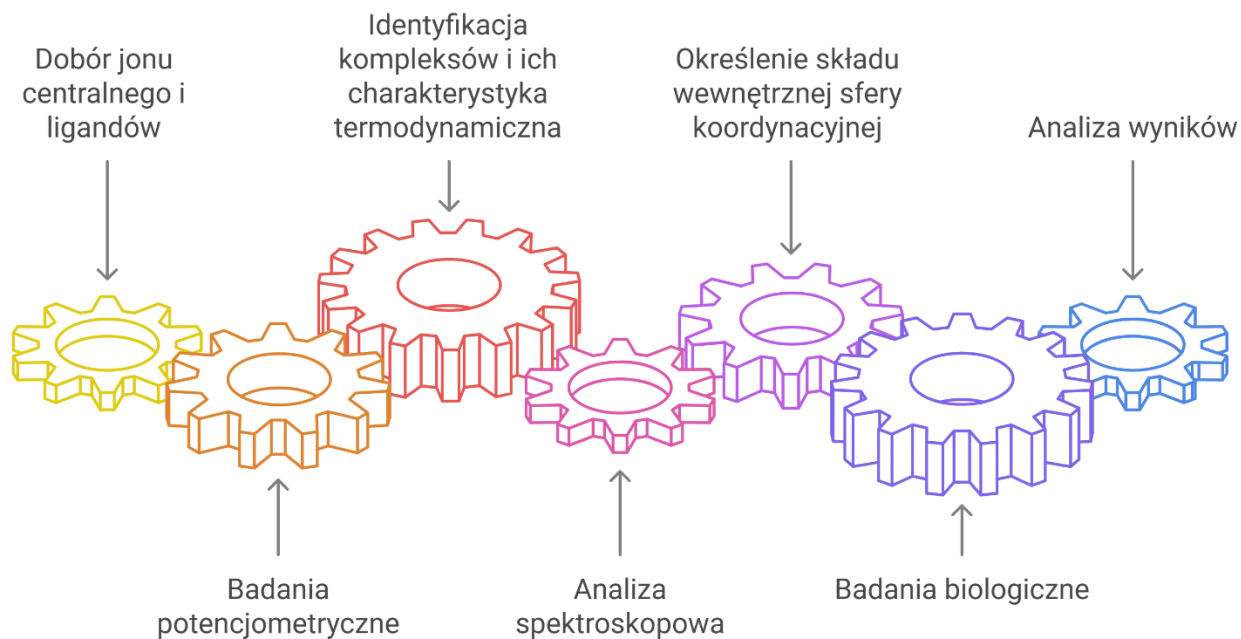


Schemat 12. Redukcja MTT do formazanu [135].

4. Cel pracy

Celem rozprawy doktorskiej jest zbadanie procesu kompleksowania w układach zawierających cukrowe pochodne urydyno-5'-difosforanu z jonami metali bloku d o znaczeniu biologicznym oraz przeprowadzenie pełnej charakterystyki termodynamicznej i spektroskopowej wyznaczonych form kompleksowych.

Zakres badań obejmuje zarówno aspekty chemiczne, jak i biologiczne, a główne etapy realizacji projektu badawczego zostały przedstawione na Rysunku 17.



Rys. 17. Główne etapy projektu badawczego.

5. Część eksperymentalna

5.1. Badane ligandy

W poniższej pracy zbadano trzy cukrowe pochodne urydyno-5'-difosforanu: kwas urydyno-5'-difosfoglukuronowy (UDP-GluA), urydyno-5'-difosfo-N-acetyloglukozaminę (UDP-GlcNAc) oraz urydyno-5'-difosfoglukozę (UDP-Glc). Wzory wykorzystanych ligandów wraz z zaznaczonymi potencjalnymi miejscami koordynacji zestawiono w Tabeli 9.

Tabela 9. Wzory strukturalne badanych ligandów (kolorem zaznaczono potencjalne miejsce koordynacji)

Nazwa liganda	Wzór strukturalny
Kwas urydyno-5'-difosfoglukuronowy	
Urydyno-5'-difosfo-N-acetyloglukozamina	
Urydyno-5'-difosfoglukoza	

5.2. Badane układy

W poniższej pracy przeprowadzono badania potencjometryczne analizowanych ligandów z jonami metali o znaczeniu biologicznym w stosunkach molowych 1:1 oraz 1:2.

W stosunku równomolowym badania prowadzono dla układów:

- Jony miedzi(II)/kwas urydyno-5'-difosfoglukuronowy
- Jony miedzi(II)/urydyno-5'-difosfo-N-acetyloglukozamina
- Jony kobaltu(II)/urydyno-5'-difosfo-N-acetyloglukozamina
- Jony niklu(II)/urydyno-5'-difosfo-N-acetyloglukozamina
- Jony miedzi(II)/urydyno-5'-difosfoglukozę
- Jony kobaltu(II)/urydyno-5'-difosfoglukozę
- Jony niklu(II)/urydyno-5'-difosfoglukozę

W stosunku 1:2 badania prowadzono dla układów:

- Jony miedzi(II)/urydyno-5'-difosfo-N-acetyloglukozamina
- Jony kobaltu(II)/urydyno-5'-difosfo-N-acetyloglukozamina
- Jony niklu(II)/urydyno-5'-difosfo-N-acetyloglukozamina
- Jony miedzi(II)/urydyno-5'-difosfoglukozę
- Jony kobaltu(II)/urydyno-5'-difosfoglukozę
- Jony niklu(II)/urydyno-5'-difosfoglukozę

5.3. Spis stosowanej aparatury

W niniejszej pracy wykorzystano aparaturę potencjometryczną i spektroskopową dostępną w Zakładzie Chemii Koordynacyjnej Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Do badań spektroskopowych NMR wykorzystano aparaturę dostępną w Instytucie Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Badania biologiczne prowadzono we współpracy z grupą badawczą Prof. dr hab. Anny Bajek. Do przeprowadzenia badań cytotoksyczności wykorzystano aparaturę dostępną w Katedrze Onkologii Wydziału Nauk o Zdrowiu Collegium Medicum w Bydgoszczy.

Pełny spis wykorzystywanej aparatury pomiarowej z nazwą producenta zestawiono w Tabeli 10.

Tabela 10. Wykorzystywana aparatura pomiarowa.

Aparatura pomiarowa	Kraj produkcji	Producent
Titrand 702 Methrom	Szwajcaria	Methrom AG
Elektroda 6.0233.100 Methrom	Szwajcaria	Methrom AG
SE/X 2457 Radiopan	Polska	Radiopan
NMR 500 MHz (11.74 T) AVANCE III Bruker	Niemcy	Bruker
NMR 700 MHz (16.44 T) AVANCE III Bruker	Niemcy	Bruker
Shimadzu UV-1900	Japonia	Shimadzu
Multiskan GO	USA	Thermo Scientific
Inkubator do hodowli komórek	USA	Thermo Scientific
SAFE 2020 Class II	USA	Thermo Scientific
Spektropolarymetr JASCO J810	Japonia	Jasco
Millipore Simplicity UV	Niemcy	Merck

5.4. Spis stosowanych odczynników

Spis stosowanych odczynników wraz z ich wzorami sumarycznymi oraz nazwą producenta zamieszczono w Tabeli 11.

Tabela 11. Spis stosowanych odczynników.

Nazwa systematyczna	Wzór sumaryczny	Producent
Sól disodowa urydyno-5'-difosfoglukozy	$C_{15}H_{22}N_2Na_2O_{17}P_2$	Merck
Sól sodowa urydyno-5'-difosfo-N-acetyloglukozaminy	$C_{17}H_{25}N_3Na_2O_{17}P_2$	Merck
Sól trisodowa kwasu urydyno-5'-difosfoglukuronowego	$C_{15}H_{19}N_2Na_3O_{18}P_2$	Merck
Azotan(V) miedzi(II)	$Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$	Merck
Azotan(V) kobaltu(II)	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	Merck
Azotan(V) niklu(II)	$Ni(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	Merck
Woda deuterowana	D_2O	Merck
Etylenodiamina	$C_2H_8N_2$	Merck
Azotan(V) potasu	KNO_3	Eurochem
Kwas chlorowodorowy (naważka analityczna)	HCl	POCH S.A.
Wodorotlenek sodu (naważka analityczna)	$NaOH$	POCH S.A.
Wodoroftalan potasu	$C_8H_5KO_4$	POCH S.A.
Tetraboran sodu	$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$	POCH S.A.
Hel 5.0	He	Linde Gaz
Glikol etylenowy	$HOCH_2CH_2OH$	Merck
Ciekły azot	N_2	Linde Gaz
Deuterotlenek sodu	$NaOD$	Merck
Chlorek deuteru	DCl	Merck

5.5. Miareczkowanie potencjometryczne

Badania potencjometryczne protonacji ligandów oraz badanych układów podwójnych prowadzono w ściśle określonych warunkach z wykorzystaniem zestawu Titrand 702 Methrom wyposażonego w autobiuretę szklaną kombinowaną 6.0233.100 Metrom (Metrohm AG, Herisau, Szwajcaria):

- Temperatura: $20^{\circ}\text{C} \pm 1$
- Siła jonowa: roztwór KNO_3 o stężeniu $0,1 \text{ mol/dm}^3$
- Atmosfera gazu obojętnego – Hel 5.0, 200 bar; $9,1 \text{ m}^3$ (Linde Gaz, Kraków, Polska)
- Zakres pomiarowy pH 2,5-11,0 [37,126]

Przed każdą serią pomiarową przeprowadzono kalibrację pH-metru stosując roztwory buforowe o pH=4,02 (ftalan) i pH=9,22 (boraks). Roztwory buforowe przygotowano następująco:

- a) Ftalan - w kolbie miarowej na 100 cm^3 rozpuszczono w wodzie demineralizowanej naważkę tetraboranu sodu o masie 1,021 g. Uzyskany roztwór miał stężenie $0,02 \text{ mol/dm}^3$
- b) Boraks - w kolbie miarowej na 100 cm^3 rozpuszczono w wodzie demineralizowanej naważkę wodoroftalanu potasu o masie 0,3814 g. Uzyskany roztwór miał stężenie $0,05 \text{ mol/dm}^3$

Dodatkowo przed każdą serią pomiarową wykonano kalibrację elektrody stosując próbkę kalibracyjną zawierającą kwas solny (HCl), azotan(V) potasu (KNO_3) oraz wodę (Tabela 12). Tak przygotowaną próbkę miareczkowano roztworem titranta (NaOH). Wykorzystane roztwory przygotowano w następujący sposób:

- a) KNO_3 – naważkę KNO_3 o masie 10,1100 g rozpuszczono w wodzie demineralizowanej w kolbie na 100 cm^3 . Stężenie przygotowanego roztworu wynosiło $0,1 \text{ mol/dm}^3$
- b) HCl – dwie odważki analityczne HCl przeniesiono ilościowo do kolby miarowej o pojemności 2000 cm^3 , a następnie rozpuszczono w wodzie demineralizowanej
- c) NaOH - dwie odważki analityczne HCl przeniesiono ilościowo do kolby miarowej o pojemności 2000 cm^3 , a następnie rozpuszczono w wodzie demineralizowanej

Tabela 12. Skład próbki kalibracyjnej.

Odczynnik	Objętość [cm ³]
Kwas solny	1,5
Azotan(V) potasu	3,0
Woda	25,5

Układy podwójne jonów metali z ligandami badano w stosunku molowym 1:1 i 1:2. Naważki analizowanych ligandów przygotowywano bezpośrednio przed każdą serią pomiarową. Stężenia analizowanych ligandów wynosiły odpowiednio: 0,001 mol/dm³ dla UDPGluA oraz 0,0005 mol/dm³ dla UDP-Glc i UDP-GlcNAc.

Badania potencjometryczne dla układu Cu/UDPGluA prowadzono w stosunku molowym 1:1, a stężenie metalu w przygotowanych próbkach wynosiło 0,001 mol/dm³.

Dla pozostałych analizowanych ligandów przeprowadzono badania w układach zawierających jony miedzi(II), kobaltu(II) oraz niklu(II). Badania prowadzono w stosunkach molowych 1:1 oraz 1:2. Stężenia jonów metali w analizowanych układach wynosiły 0,0005 mol/dm³. Dla każdego z analizowanych układów pomiar powtórzono 8-razy. Skład wszystkich analizowanych próbek przedstawiono w Tabeli 13.

Tabela 13. Skład analizowanych próbek.

Odczynnik	Masa [g]		Objętość [cm ³]	
	1:1	1:2	1:1	1:2
Układ 1				
Jony miedzi(II)	0,0072	-	-	-
Kwas urydyno-5'-difosfoglukuronowy	0,0194	-	-	-
HCl	-	-	1,50	1,50
KNO ₃	-	-	3,0	3,0
H ₂ O	-	-	25,50	25,50
Układ 2				
Jony miedzi(II)	0,0036	0,0036	-	-
Urydyno-5'-difosfo-N-acetyloglukozamina	0,0098	0,0196	-	-
HCl	-	-	1,50	1,50
KNO ₃	-	-	3,0	3,0
H ₂ O	-	-	25,50	25,50
Układ 3				
Jony kobaltu(II)	0,0044	0,0044	-	-
Urydyno-5'-difosfo-N-acetyloglukozamina	0,0098	0,0196	-	-
HCl	-	-	1,50	1,50
KNO ₃	-	-	3,0	3,0
H ₂ O	-	-	25,50	25,50
Układ 4				
Jony niklu(II)	0,0044	0,0044	-	-
Urydyno-5'-difosfo-N-acetyloglukozamina	0,0098	0,0196	-	-

HCl	-	-	1,50	1,50
KNO ₃	-	-	3,0	3,0
H ₂ O	-	-	25,50	25,50
Układ 5				
Jony miedzi(II)	0,0044	0,0036	-	-
Urydyno-5'-difosfoglukoza	0,0092	0,0184	-	-
HCl	-	-	1,50	1,50
KNO ₃	-	-	3,0	3,0
H ₂ O	-	-	25,50	25,50
Układ 6				
Jony kobaltu(II)	0,0044	0,0044	-	-
Urydyno-5'-difosfoglukoza	0,0092	0,0184	-	-
HCl	-	-	1,50	1,50
KNO ₃	-	-	3,0	3,0
H ₂ O	-	-	25,50	25,50
Układ 7				
Jony niklu(II)	0,0044	0,0044	-	-
Urydyno-5'-difosfoglukoza	0,0092	0,0184	-	-
HCl	-	-	1,50	1,50
KNO ₃	-	-	3,0	3,0
H ₂ O	-	-	25,50	25,50

Otrzymane wyniki analizowano z wykorzystaniem programu komputerowego HYPERQUAD2008 (Hyperquad Limited, Leeds, UK), określając stałe protonacji ligandów, ogólne stałe trwałości ($\log\beta$) form kompleksowych występujących w badanych układach [37,139]. Stałe równowagi reakcji tworzenia ($\log K_e$) $oM + pL + qH \rightleftharpoons M_oL_pH_q$ obliczono z wykorzystaniem poniższego równania [135]:

$$\beta = \frac{M_o L_p H_q}{[M]^o [L]^p [H]^q} \quad (3)$$

Poprawność przyjętych modeli potwierdzono na podstawie zbieżności krzywej doświadczalnej i krzywej teoretycznej wygenerowanej komputerowo oraz analizy wartości odchyłeń standardowych wartości $\log\beta$ [38,139,140].

Wykorzystane w obliczeniach stałe hydrolizy jonów metali ($\log\beta_{Cu(OH)_2} = -13,13$; $\log\beta_{Co(OH)_2} = -17,89$; $\log\beta_{Ni(OH)_2} = -17,79$) oraz wartość iloczynu jonowego wody ($pK_w = -13,78$) wykorzystano z opublikowanych wcześniejszych danych [140,141]. Krzywe dystrybucji form dla każdego z analizowanych układów sporządzono z wykorzystaniem programu komputerowego HySS (Hyperquad Simulation and Speciation) [37,139].

5.6. Spektroskopia UV-Vis

W celu przeprowadzenia badań spektroskopowych UV-Vis przygotowano próbki o objętości 15 cm³. Stężenia jonów metali w przygotowanych próbkach były takie same jak stężenia wykorzystane w badaniach potencjometrycznych: 0,001 mol/dm³ dla układu Cu(II)/UDPGluA oraz 0,0005 mol/dm³ dla pozostałych analizowanych układów. Badania prowadzono w stosunku molowym 1:1 dla układu Cu(II)/UDPGluA oraz w stosunkach molowych 1:1 i 1:2 dla układów Cu(II)/UDP-Glc, Cu(II)/UDP-GlcNAc, Co(II)/UDP-Glc, Co(II)/UDP-GlcNAc, Ni(II)/UDP-Glc, Ni(II)/UDP-GlcNAc. Wszystkie próbki przygotowywano poprzez rozpuszczenie odpowiednich naważek soli jonów metali i ligandów w wodzie demineralizowanej (Tabela 14).

Tabela 14. Skład masowy próbek do pomiarów spektroskopowych UV-Vis.

Odczynnik	Masa [g]
Cu(II)/UDPGluA	
Jony Cu²⁺	0,0036
UDPGluA	0,0096
M(II)/UDP-Glc 1:1	
Jony Cu²⁺	0,0018
Jony Co²⁺	0,0022
Jony Ni²⁺	0,0022
UDP-Glc	0,0045
M(II)/UDP-Glc 1:2	
Jony Cu²⁺	0,0018
Jony Co²⁺	0,0022
Jony Ni²⁺	0,0022
UDP-Glc	0,0090
M(II)/UDP-GlcNAc 1:1	
Jony Cu²⁺	0,0018
Jony Co²⁺	0,0022
Jony Ni²⁺	0,0022
UDP-GlcNAc	0,0049
M(II)/UDP-GlcNAc 1:2	
Jony Cu²⁺	0,0018
Jony Co²⁺	0,0022
Jony Ni²⁺	0,0022
UDP-GlcNAc	0,0098

Badania prowadzono z wykorzystaniem spektrofotometru dwuwiązkowego SHIMADZU UV-1900 (Shimadzu, Japonia) z wykorzystaniem kuwety Plastibrand PMMA (Brand, Wertheim, Niemcy) o długości drogi optycznej wynoszącej 1 cm. Pomiar prowadzono w temperaturze pokojowej (25°C) w pH dominacji poszczególnych form kompleksowych

wyznaczonych na podstawie dystrybucji form kompleksowych. Badania prowadzono w zakresie długości fali od 350 nm do 900 nm, z wykorzystaniem programu UVProbe [37,139].

5.7. Spektroskopia NMR

Badania spektroskopowe NMR przeprowadzono dla układu jony miedzi(II)/kwas urydyno-5'-difosfoglukuronowy dla kompleksów o pH dominacji 5,0 i 8,0. Próbkę przygotowano poprzez rozpuszczenie odpowiednich reagentów w D₂O, a wartość pD każdej z analizowanych próbek ustalono z wykorzystaniem roztworów NaOD i DCl wykorzystując zależność [37,142]:

$$pD = pH + 0,4 \quad (4)$$

Stężenie liganda w analizowanych próbkach wynosiło 0,05 mol/dm³, a stosunek metalu do liganda wynosił 1:100 [37].

Badania spektroskopowe ¹²C NMR i ³¹P NMR prowadzono za pomocą spektrometru NMR 500 MHz (11.74 T) AVANCE III oraz NMR 700 MHz (16.44 T) AVANCE III Bruker Bruker (Bruker, Karlsruhe, Niemcy) we współpracy z pracownią NMR Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu.

5.8. Spektroskopia EPR

Próbki do badań spektroskopowych EPR przygotowywano w mieszaninie woda:glikol w stosunku molowym 3:1. Objętość molowa przygotowanych próbek wynosiła 10 cm³, a stężenie jonów miedzi(II) wynosiło 0,005 mol/dm³ dla układu Cu(II)/UDPGluA oraz 0,001 mol/dm³ dla układów Cu(II)/UDP-Glc oraz Cu(II)/UDP-GlcNAc. Badania prowadzono w stosunku molowym 1:1 dla układu zawierającego kwas urydyno-5'-difosfoglukuronowy oraz w stosunkach molowych 1:1 i 1:2 dla układów zawierających urydyno-5'-difosfoglukozę oraz urydyno-5'-difosfo-N-acetyloglukozamine. Próbki przygotowano w pH dominacji poszczególnych form kompleksowych.

Przygotowane próbki umieszczono w szklanych rurkach kapilarnych o pojemności 130 µl, a następnie wprowadzono do komory pomiarowej. Badania prowadzono za pomocą spektrometru SE/X 2457 Radiopan (Radiopan, Poznań, Polska) w temperaturze wrzenia ciekłego azotu -196°C [37,139].

5.9. Spektroskopia CD

Widma CD i odpowiadające im widma UV zarejestrowano na spektropolarymetrze JASCO J810 (JASCO, Japonia) w temperaturze otoczenia. Widma rejestrowano w zakresie 185-400 nm w roztworach wodnych i kumulowano z czterema skanami zarówno dla UDP-GluA, jak i jego kompleksów z jonami miedzi(II). Woda do eksperymentów była dodatkowo oczyszczana za pomocą aparatu Merck Millipore Simplicity UV (Merck, Darmstadt, Niemcy) w celu obniżenia absorbancji, szczególnie w krótkofalowej części zakresu pomiarowego. Pomiary przeprowadzono w atmosferze gazu N₂ (przepływ 10 l/min), a długość drogi optycznej wynosiła 0,1 cm [37].

Stężenia mierzonych roztworów wynosiły 1×10^{-4} mol/dm³, co pozwoliło na utrzymanie absorbancji na akceptowalnym poziomie. Badania prowadzono przy pH 3,0 oraz 10,0 dla UDP-GluA oraz przy pH dominacji poszczególnych form kompleksowych dla układu Cu(UDP-GluA) [37].

5.10. Badania biologiczne

Wstępne badania biologiczne przeprowadzono dla układów Cu(II)/UDPGluA oraz Cu(II)/UDP-GlcNAc w stosunku molowym 1:1. Do badań wykorzystano kompleksy o najwyższej procentowej zawartości jonów miedzi(II), które wytypowano na podstawie analizy krzywych dystrybucji form.

Do badań cytotoksyczności wykorzystano linie komórkowe A549 (komórki raka płuc) oraz linie komórkowe T24 (komórki raka pęcherza moczowego [37]). Komórki te były rutynowo hodowane w pożywce F-12K uzupełnionej płodową surowicą bydlęcą do końcowego stężenia 10%. Utrzymywano je w temperaturze 37°C w nawilżanym inkubatorze do hodowli komórkowych (Thermo Fisher Scientific) z 5% CO₂ w stężeniu od 6x10³ do 6x10⁴ komórek na cm². Standardowa pożywka była zmieniana dwa lub trzy razy w tygodniu [37].

Komórki zostały odłączone od powierzchni wzrostu, policzone i przeniesione do 96-dołkowych płytek w gęstości 4,5x10³ komórek na cm². Po 24-godzinnej preinkubacji w standardowych warunkach, dodawano badane związki i hodowano komórki przez 24 lub 72 godziny. Pożywkę usuwano, a komórki inkubowano z roztworem MTT (1 mg/ml) przez 1 godzinę w temperaturze 37°C. Utworzone fioletowe kryształy formazanu rozpuszczono w DMSO (StanLab). Absorbancję odczytano przy OD 570 nm oraz 650 nm przy użyciu czytnika mikropłytek Multiskan Sky (Thermo Fisher Scientific) [37].

Przeprowadzono również badanie cytotoksyczności analizowanych związków względem prawidłowych komórek organizmu. W tym celu komórki nabłonka urotelialnego (SV HUC1) poddano działaniu analizowanych ligandów i związków kompleksowych przez okres 24 h.

6. Wyniki i Dyskusja

6.1.1. Protonacja ligandów

Początkowym etapem prowadzonych badań było wyznaczenie stałych protonacji dla badanych ligandów: kwasu urydyno-5'-difosfoglukuronowego (UDP-GluA), urydyno-5'-difosfo-N-acetyloglukozaminy (UDP-GlcNAc) oraz urydyno-5'-difosfoglukozy (UDP-Glc). Wartości te zostały określone metodą potencjometryczną, a uzyskane wyniki zestawiono w Tabeli 15.

Tabela 15. Stałe protonacji ($\log\beta$) oraz stałe równowag tworzenia ($\log K_e$) dla UDP-GluA (odchylenia standardowe podano nawiasach) [37].

Forma	($\log\beta$)	($\log K_e$)	Reakcja
kwas urydyno-5'-difosfoglukuronowy (UDP-GluA)			
(H ₃ UDP-GluA)	13,85(5)	2,17	(HUdp-GluA) ²⁻ + H ⁺ $\rightleftharpoons$ (HUdp-GluA) ⁻
(H ₂ UDP-GluA)	11,67(4)	3,01	(HUdp-GluA) ³⁻ + H ⁺ $\rightleftharpoons$ (HUdp-GluA) ²⁻
(HUdp-GluA)	8,66(2)	8,66	(UDP-GluA) ⁴⁻ + H ⁺ $\rightleftharpoons$ (HUdp-GluA) ³⁻
urydyno-5'-difosfo-N-acetyloglukozamina (UDP-GlcNAc)			
H ₄ UDP-GlcNAc	18,18(5)	5,41	(H ₂ UDP-GlcNAc) ²⁻ + 2H ⁺ $\rightleftharpoons$ H ₄ UDP-GlcNAc
H ₂ UDP-GlcNAc	12,77(6)	3,16	(HUdp-GlcNAc) ³⁻ + H ⁺ $\rightleftharpoons$ (H ₂ UDP-GlcNAc) ²⁻
HUdp-GlcNAc	9,62(5)	9,62	(UDP-GlcNAc) ⁴⁻ + H ⁺ $\rightleftharpoons$ (HUdp-GlcNAc) ³⁻
urydyno-5'-difosfoglukoza (UDP-Glc)			
HUdp-Glc	9,69(6)	9,69	(UDP-Glc) ³⁻ + H ⁺ $\rightleftharpoons$ (HUdp-Glc) ²⁻

Badania termodynamiczne wykazały, że analizowane ligandy posiadają różnorodne potencjalne miejsca koordynacyjne, w tym:

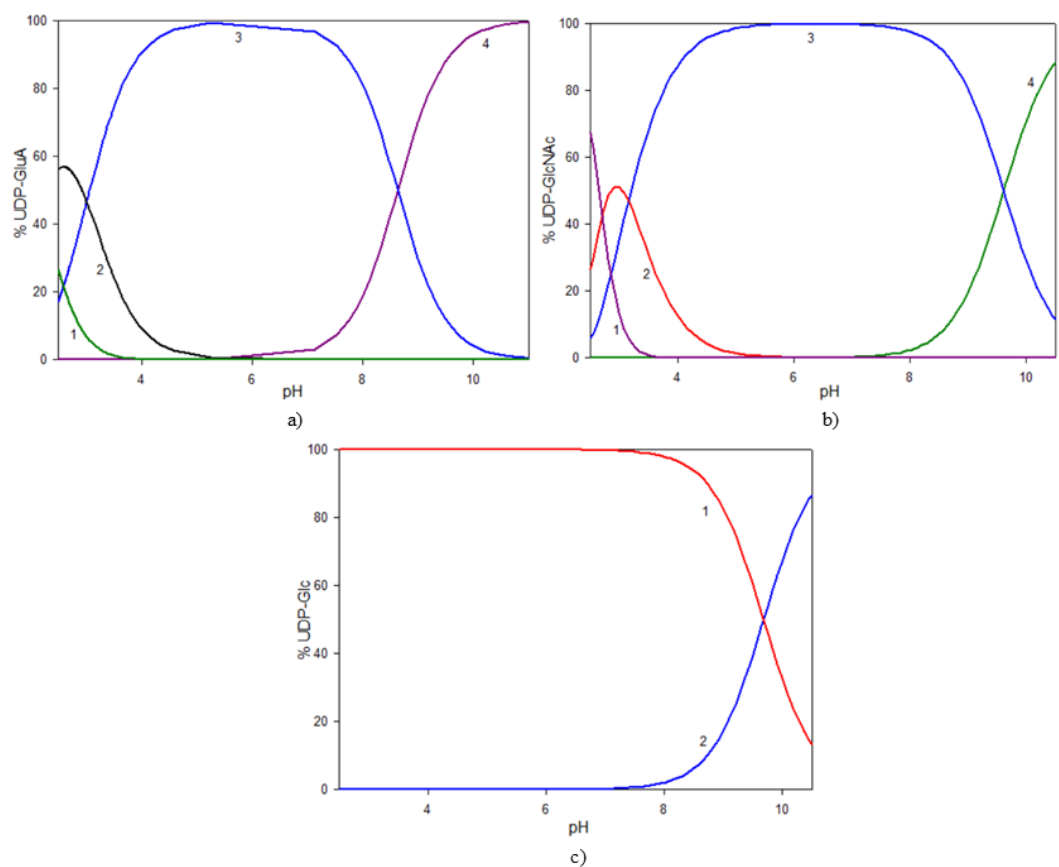
- **UDP-GluA:** grupa karboksylowa (–COOH), grupa aminowa pierścienia urydyny (–N(3)H) oraz dwie reszty fosforanowe (–O-PO₃H),
- **UDP-GlcNAc:** dwie reszty fosforanowe (–O-PO₃H), atom azotu w pierścieniu urydyny (–N(3)) w pierścieniu urydyny oraz atom azotu grupy acetylowej (–NH-CO-CH₃),
- **UDP-Glc:** dwie reszty fosforanowe (–O-PO₃H) oraz atom azotu (–N(3)H) w pierścieniu urydyny.

Dla kwasu urydyno-5'-difosfoglukuronowego (UDP-GluA) deprotonacja grupy (–O-PO₃H) ($\log\beta=13,85$, $\log K_e=2,17$) i grupy –COOH ($\log\beta=11,67$, $\log K_e=3,01$) rozpoczyna się przy wartości pH poniżej 2,5. Forma H₃UDP-GluA występuje w układzie do wartości pH około 4,0. H₂UDP-GluA swoje maksimum osiąga przy pH około 3,0 stanowiąc ponad 55% wszystkich gatunków i występuje w układzie do wartości pH około 5,5. Przy wyższych

wartościach pH następuje deprotonacja atomu azotu z grupy (-N(3)H) ($\log\beta=8,66$, $\log K_e=8,66$). Forma HUDP-GluA dominuje w roztworze do pH około 9,5 i w swoim maksimum stanowi około 100% wszystkich form w układzie. Przy pH powyżej 9,5 układ jest zdominowany przez całkowicie zdeprotonowaną formę liganda, która przy pH 10,5 jest jedyną formą dostępną w układzie. (Rysunek 18a).

Deprotonacja formy $H_4UDP-GlcNAc$ ($\log\beta=18,18$; $\log K_e=5,41$) rozpoczyna się poza analizowanym zakresem pH. Przy pH około 2,5 forma ta stanowi około 70% wszystkich form dostępnych w układzie. Przy pH 3,0 dominuje częściowo sprotonowana forma liganda $H_2UDP-GlcNAc$ ($\log\beta=12,77$; $\log K_e=3,16$), obejmującą blisko 50% ogółu specjacji. W całym analizowanym zakresie pH w roztworze obecna jest forma, HUDP-GlcNAc ($\log\beta=9,62$; $\log K_e=9,62$), która dominuje w układzie w przedziale pH 3,5-9,5, a w przedziale pH 5,5-7,0 jest jedyną obecną w układzie formą. Całkowicie zdeprotonowana forma liganda, UDP-GlcNAc, staje się dominująca przy pH powyżej 9,5, osiągając maksymalny udział sięgający 85% (Rys. 18b).

Proces deprotonacji urydyno-5'-difosfoglukozy (UDP-Glc) rozpoczyna się poniżej początkowego zakresu pH (Rys. 18c). Forma HUDP-Glc dominuje w układzie do wartości pH około 9,5. W przedziale pH od 2,5 do 7,5 stanowi ona 100% obecnych w roztworze form. Przy pH 7,0 obserwowana jest deprotonacja atomu azotu w pierścieniu urydyny, a od pH 9,5 całkowicie zdeprotonowana cząsteczka $(UDP-Glc)^{3-}$ jest formą dominującą, która przy pH 10,5 stanowi blisko 90% wszystkich form obecnych w układzie.



Rys. 18. Krzywe dystrybucji form dla protonacji: a) UDP-GluA (1- $\text{H}_3\text{UDP-GluA}$, 2- $\text{H}_2\text{UDP-GluA}$, 3- HUDP-GluA , 4- UDP-GluA) [43], b) UDP-GlcNAc (1- $\text{H}_4\text{UDP-GlcNAc}$, 2- $\text{H}_2\text{UDP-GlcNAc}$, 3- HUDP-GlcNAc , 4- UDP-GlcNAc), c) UDP-Glc (1- HUDP-Glc , 2- UDP-Glc).

6.2. Układ jon metalu/kwas urydyno-5'-difosfoglukuronowy

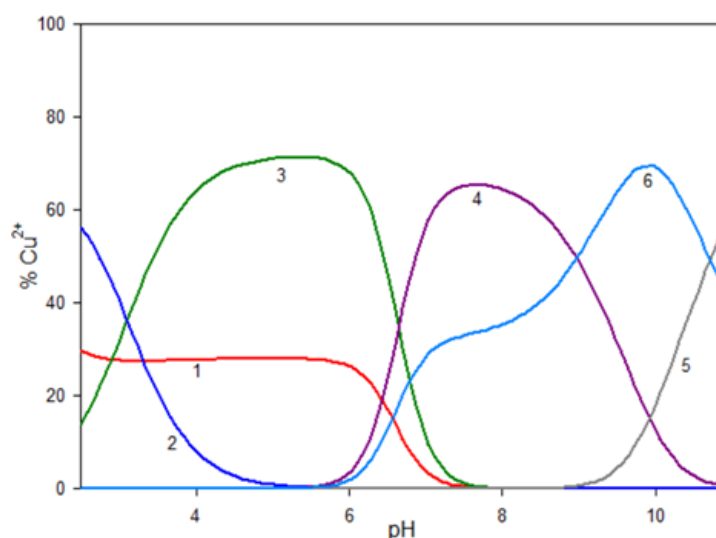
Analiza komputerowa danych otrzymanych z miareczkowania potencjometrycznego w układzie jony miedzi(II)/kwas urydyno-5'-difosfoglukuronowy w stosunku molowym wynoszącym 1:1 wykazała występowanie w układzie czterech form kompleksowych: $\text{Cu}(\text{H}_2\text{UDP-GluA})$, $\text{Cu}(\text{HUDP-GluA})$, $\text{Cu}(\text{UDP-GluA})(\text{OH})$ oraz $\text{Cu}(\text{UDP-GluA})(\text{OH})_3$. Wyznaczone dla tych form kompleksowych ogólne stałe trwałości ($\log\beta$) oraz stałe równowag reakcji tworzenia ($\log K_e$) zestawiono w tabeli (Tabela 16) [37].

Tabela 16. Ogólne stałe trwałości ($\log\beta$) i stałe równowag reakcji tworzenia ($\log K_e$) kompleksów utworzonych w badanym układzie (odchylenia standardowe podano w nawiasach) [37].

Forma kompleksu	$\log\beta$	$\log K_e$	Reakcja
$\text{Cu}(\text{H}_2\text{UDP-GluA})$	15,61(3)	3,94	$\text{Cu}^{2+} + (\text{H}_2\text{UDP-GluA}) \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{H}_2\text{UDP-GluA})$
$\text{Cu}(\text{HUDP-GluA})$	12,52(2)	3,86	$\text{Cu}^{2+} + (\text{HUDP-GluA}) \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{HUDP-GluA})$
$\text{Cu}(\text{UDP-GluA})(\text{OH})$	-0,78(2)	12,98	$\text{Cu}^{2+} + \text{UDP-GluA} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{UDP-GluA})(\text{OH}) + \text{H}^+$
$\text{Cu}(\text{UDP-GluA})(\text{OH})_3$	-20,87(3)	7,45	$\text{Cu}(\text{UDP-GluA})(\text{OH}) + 2\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{UDP-GluA})(\text{OH})_3 + 2\text{H}^+$

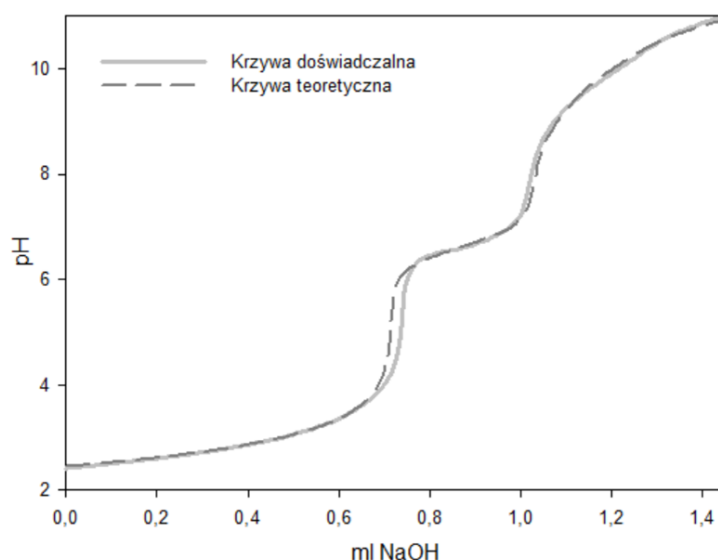
Brak obserwacji tworzenia form $\text{Cu}(\text{UDP-GluA})$ oraz $\text{Cu}(\text{UDP-GluA})(\text{OH})_2$ może być spowodowany ich niskim stężeniem, które jest nierejestrowalne przy zastosowanych metodach badawczych [37].

Proces kompleksowania w analizowanym układzie rozpoczyna się poniżej startowego pH próbki. Poniżej pH 2,5 w układzie dominuje forma $\text{Cu}(\text{H}_2\text{UDP-GluA})$, która wiąże ponad 55% jonów miedzi(II) obecnych w roztworze. Kolejna forma sprotonowana $\text{Cu}(\text{HUDP-GluA})$ tworzy się w układzie poniżej pH 2,5. Kompleks ten wiąże około 70% jonów Cu^{2+} , a swoje maksimum osiąga przy pH w zakresie 5,0-5,5. Przy pH około 6,0 w roztworze tworzy się pierwszy hydroksokompleks, $\text{Cu}(\text{UDP-GluA})(\text{OH})$. Związek ten dominuje w układzie przy wartości pH 8,0, a blisko 65% wszystkich jonów obecnych w roztworze uczestniczy w koordynacji. Hydroksokompleks, $\text{Cu}(\text{UDP-GluA})(\text{OH})_3$, występuje w układzie od pH około 8,0, a swoje maksimum osiąga poza badanym zakresem pH, przy pH 10,5 wiąże około 55% jonów miedzi(II). Stwierdzono, że przy pH około 10,0 dominującą formą w układzie jest wodorotlenek miedzi(II) (Rys. 19) [37].



Rys. 19. Krzywe dystrybucji form w układzie Cu(II)/UDP-GluA (1-Cu²⁺, 2-Cu(H₂UDP-GluA), 3-Cu(HUDP-GluA), 4-Cu(UDP-GluA)(OH), 5-Cu(UDP-GluA)(OH)₃, 6-Cu(OH)₂) [37].

Potwierdzeniem tworzenia się zaproponowanych form kompleksowych są relatywnie niskie wartości odchyłeń standardowych ($\log\beta$) oraz porównanie krzywej doświadczalnej z krzywą teoretyczną wygenerowaną komputerowo (Rys. 20).



Rys. 20. Porównanie krzywej doświadczalnej i krzywej teoretycznej dla układu Cu(II)/UDP-GluA.

W celu określenia sposobu koordynacji w badanych związkach kompleksowych przeprowadzono szereg badań spektroskopowych UV-Vis, EPR, NMR oraz CD. Na podstawie sporządzonych wykresów dystrybucji określono pH dominacji form kompleksowych tworzących się w badanym układzie. Badania UV-Vis, EPR oraz CD prowadzono dla każdego wyznaczonego kompleksu przy wartości pH ich dominacji, a badania NMR przeprowadzono przy pH 5,0 i 8,0. Pomiary spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego, wykonano

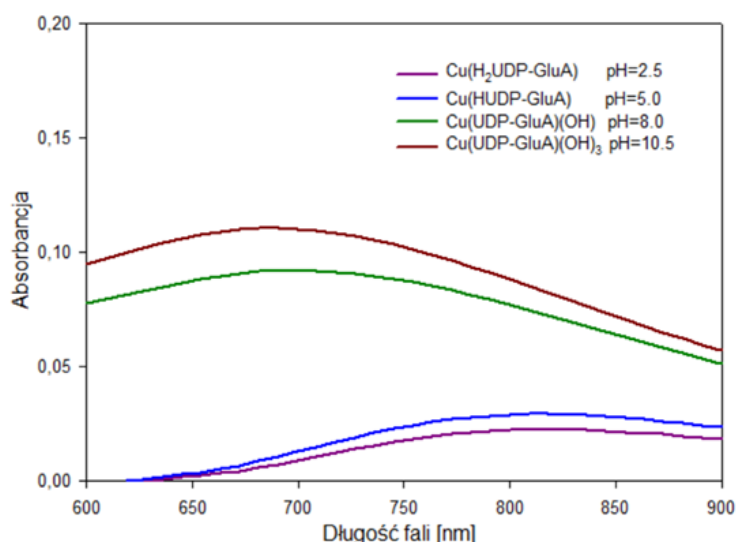
jedynie dla dwóch form kompleksowych, które wykazują najwyższą zawartość jonów miedzi(II).

Przeprowadzone badania spektroskopowe UV-Vis oraz EPR pozwoliły na analizę wewnętrznej sfery koordynacyjnej związków kompleksowych. Otrzymane parametry spektroskopowe zestawiono w Tabeli 17.

Tabela 17. Parametry spektroskopowe UV-Vis oraz EPR dla kompleksów tworzących się w układzie Cu(II)/UDP-GluA [37].

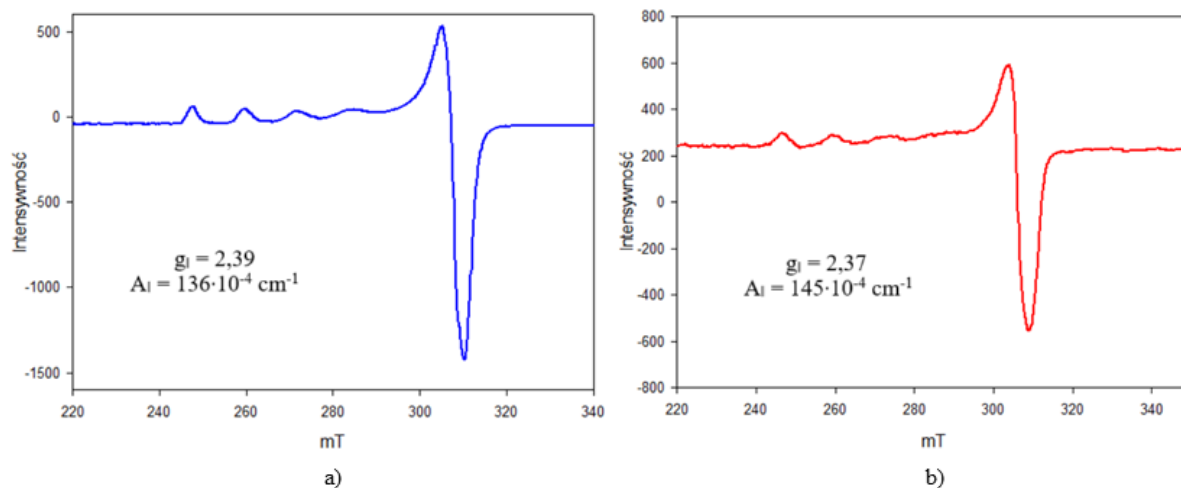
Forma kompleksu	pH	g_l	A_l [cm ⁻¹]	λ_{max} [nm]	ϵ [M ⁻¹ cm ¹]	Absorbancja	Chromofor
Cu(H ₂ UDP-GluA)	2,5	2,39	136·10 ⁻⁴	810	23	0,023	{1O}
Cu(HUDP-GluA)	5,0	2,37	145·10 ⁻⁴	800	30	0,030	{1O}
Cu(UDP-GluA)(OH)	8,0	-	-	710	93	0,093	{1N, 2O}
Cu(UDP-GluA)(OH) ₃	10,5	-	-	690	112	0,112	{1N, 3O}

Zmiana wewnętrznej sfery koordynacyjnej w kompleksach zawierających jony miedzi(II) wiąże się z przesunięciem absorbancji w kierunku niższych długości fali (Rys. 21). W przypadku kompleksów Cu(H₂UDP-GluA) i Cu(HUDP-GluA) koordynacja zachodzi poprzez jeden atom tlenu pochodzący z grupy karboksylowej (-COOH) cząsteczki kwasu glukuronowego lub reszty fosforanowej (-O-PO₃H). Wraz ze wzrostem wartości pH atom azotu w cząsteczce UDP-GluA ulega deprotonacji umożliwiając tworzenie dodatkowego wiązania koordynacyjnego. Wewnętrznej sfera koordynacyjna kompleksu Cu(UDP-GluA)(OH) zawiera: atom azotu -(N(3)H) z pierścienia urydyny oraz atomy tlenu z grupy karboksylowej kwasu glukuronowego oraz reszty fosforanowej UDP, a dla związku Cu(UDP-GluA)(OH)₃ koordynacja zachodzi przez atom azotu -(N(3)H) oraz trzy atomy tlenu pochodzące z grupy -(COOH) oraz dwóch reszt fosforanowych -(O-PO₃H) [37].



Rys. 21. Widmo UV-Vis dla układu Cu(II)/UDP-GluA [37].

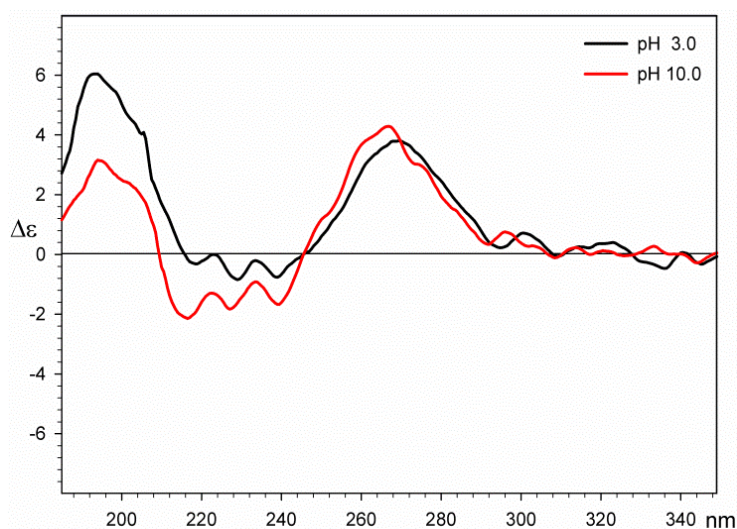
Na podstawie analizy widm EPR potwierdzono tworzenie się monomerycznych form kompleksowych w badanym układzie i zaobserwowano widma charakterystyczne dla jonów miedzi(II) (Rys. 22). Parametry spektralne $g_{\parallel} = 2,39$ i $A_{\parallel} = 136 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ dla kompleksu Cu(H₂UDP-GluA) oraz $g_{\parallel} = 2,37$ i $A_{\parallel} = 145 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ dla kompleksu Cu(HUDP-GluA) wskazują na udział jednego atomu tlenu w tworzeniu wiązania koordynacyjnego. Badania nie zostały przeprowadzone dla dominujących form kompleksowych przy pH=8,0 i pH=10,5 ze względu na tworzenie się osadów w przygotowanych próbkach.



Rys. 22. Widma spektroskopowe EPR dla kompleksów: a) Cu(H₂UDP-GluA), b) Cu(HUDP-GluA) [37].

W celu wykluczenia wpływu protonowania/deprotonowania na konformację badanego liganda przeprowadzono serię pomiarów CD kwasu urydyno-5'-difosfoglukuronowego przy różnych wartościach pH. Na podstawie wyników badań potencjometrycznych wybrano

wartości pH, przy których cząsteczka liganda jest sprotonowana (pH=3,0) oraz całkowicie zdeprotonowana (pH=10,0). Otrzymane wyniki potwierdzają, że nie ma znaczących zmian w widmach CD w zakresie 250-280 nm, które pochodzą z absorpcji zasady urydynowej. Maksimum obserwowane dla roztworu kwaśnego wynosi $\Delta\epsilon = 3,81$ przy 269 nm, a $\Delta\epsilon = 4,29$ przy 266 dla roztworu zasadowego. W krótkofalowej części widma można zaobserwować ujemny efekt Cottona dla próbki w roztworze podstawowym. Wynik ten jest związany z deprotonacją chiralnego kwasu karboksylowego, która odpowiedzialna jest za zmianę przejścia typu $n-\pi^*$ i jego maksimum w kierunku krótszych długości fal ($\Delta\epsilon = -0,84$ przy 228 nm dla roztworu kwaśnego i $\Delta\epsilon = -2,14$ przy 216 dla roztworu zasadowego) [142,143]. Zarejestrowane widma CD dla obu roztworów przedstawiono na Rysunku 23 i wskazują one, że konformacja kwasu urydyno-5'-difosfoglukuronowego nie zależy od pH w roztworach wodnych.



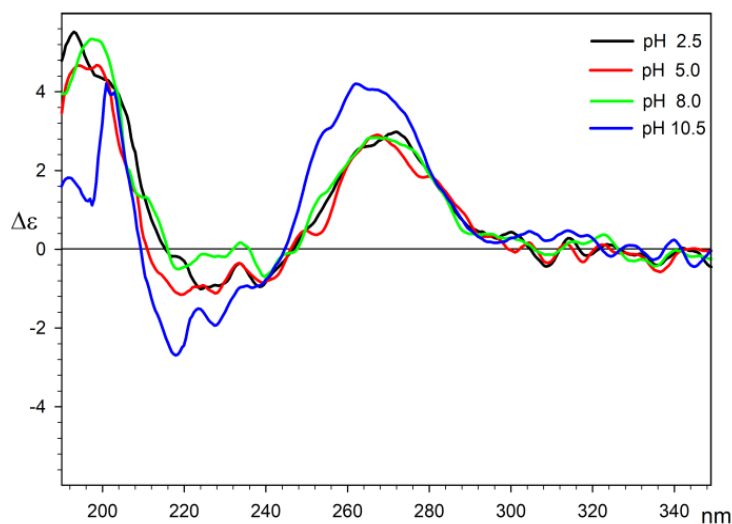
Rys. 23. Widma dichroizmu kołowego kwasu urydyno-5'-difosfoglukuronowego w wodzie przy pH=3 (czarna linia) i pH=10,0 (czerwona linia) [37].

Koordinacja jonów Cu^{2+} z kwasem urydyno-5'-difosfoglukuronowym jest możliwa poprzez różnorodne potencjalne miejsc donorowe cząsteczki liganda, co ma wpływ na zmiany konformacyjne obserwowane w pomiarach CD. Sposób koordynacji atomu centralnego zależy od pH roztworu, co obserwowane jest na wykresach dystrybucji form układu Cu(II)/UDP-GluA . Dla pomiarów przeprowadzonych przy pH dominacji tworzących się związków kompleksowych obserwuje się tę podobną sekwencję efektów Cottona z dodatnim efektem długofalowym zlokalizowanym w zakresie 262-272 nm oraz ujemnym efektem Cottona zlokalizowanym w zakresie 218-239 nm [37] (Tabela 18).

Tabela 18. Efekty Cottona dla układu Cu(II)/UDPGluA w roztworach wodnych [37].

pH	2,5	5,0	8,0	10,5
$\Delta\epsilon$ (nm)	2,98 (272)	2,91 (267)	2,85 (267)	4,21 (262)
	-0,95 (239)	-0,85 (239)	-0,70 (239)	-0,98 (237)
	-1,01 (224)	-1,11 (228)	-0,19 (227)	-1,94 (227)
		-1,15 (219)	-0,50 (219)	-2,70 (218)

Wyniki wskazują na brak istotnych zmian w konformacji liganda w zakresie pH 2,5-8,0, a przy pH = 10,5 obserwuje się zwiększoną intensywność oraz przesunięcie jego maksimum, co jest zgodne z pomiarami NMR i może być związane ze zmianą atomów donorowych w układzie. Dodatkowo zmiana ta może być również związana z przesunięciem równowagi tautomerizacji laktam-laktim promowanej zasadą, co jest również obserwowane w przesunięciu sygnału C4 w widmach ^{13}C NMR. Ujemne efekty Cottona w zakresie 218-239 nm wynikają z oddziaływania reszty kwasu karboksylowego ze środowiskiem chiralnym. Obserwowana jest tendencja do zwiększania intensywności tych efektów i przesunięcia ich w kierunku krótszych długości fal wraz ze wzrostem pH, jednak wzajemne sąsiedztwo pozytywnych efektów Cottona o stosunkowo dużej intensywności może wpływać na ich wysokość i położenie na widmie CD, co utrudnia ich dokładną interpretację. Widma CD układu Cu(II)/UDP-GluA przedstawiono na Rysunku 24 [37].

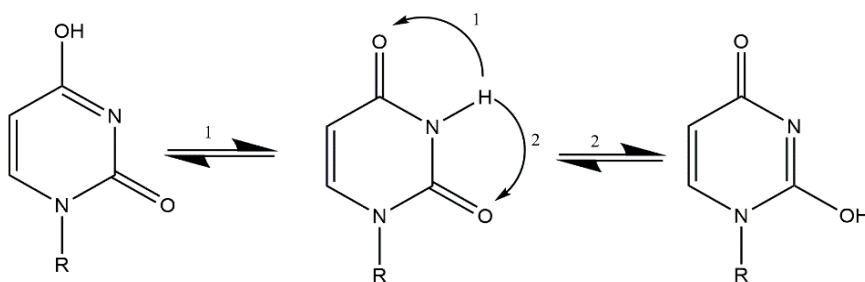
**Rys. 25.** Widma dichroizmu kołowego układu Cu(II)/kwas urydyno-5'-difosfoglukuronowego [37].

Przeprowadzono badania spektroskopowe ^{13}C NMR oraz ^{31}P NMR dla wolnego liganda oraz jego kompleksów przy dwóch wartościach pH: 5,0 i 8,0. Uzyskane dane zestawiono w Tabeli 19.

Tabela 19. Przesunięcia chemiczne (ppm) w widmach ^{13}C NMR i ^{31}P NMR w układzie Cu(II)/UDP-GluA [37].

Forma kompleksu	pH	(UDP-GluA)				
		C2	C4	C6'	P1	P2
Cu(HUDP-GluA)	5,0	0,06	-0,03	0,20	-	7,93
Cu(UDP-GluA)(OH)	8,0	-0,05	-0,91	0,70	0,16	4,50

Analiza widm ^{13}C NMR i ^{31}P NMR wykazała zmiany przesunięć chemicznych między wolnym ligandem, a jego kompleksami. Przy niższych wartościach pH (5,0) zauważalne zmiany przesunięć chemicznych zaobserwowano dla atomu węgla C6' (0,20 ppm) pochodzącego z cząsteczki kwasu glukuronowego oraz dla atomu fosforu P2 (7,93 ppm). Sugeruje to, że koordynacja w kompleksie Cu(HUDP-GluA) zachodzi przez atom tlenu kwasu glukuronowego lub atom tlenu reszty fosforanowej cząsteczki UDP. W warunkach zasadowych (pH 8,0) odnotowano przesunięcia chemiczne dla atomu węgla C4 (-0,91 ppm) i atomu fosforu P2 (4,5 ppm) w cząsteczce UDP, a także dla atomu węgla C6' (-0,70 ppm) cząsteczki kwasu glukuronowego. Zmiany te można przypisać deprotonacji atomu azotu pierścienia uracylowego przy wyższych wartościach pH, oraz obecności tautomerii laktam-laktim (Rys. 25). Przy pH 8,0 koordynacja prawdopodobnie zachodzi poprzez atom tlenu przy atomie węgla C4 w pierścieniu urydyny, jeden z atomów tlenu grupy fosforanowej oraz atom tlenu z grupy karbonylowej kwasu D-glukuronowego [37]. Dodatkowo, zmiana przesunięcia chemicznego atomu fosforu P1 (0,16 ppm) wskazuje na zwiększoną aktywność tej grupy w warunkach zasadowych.



Rys. 25. Tautomeria laktamowo-laktimowa w cząsteczce urydyny i jej pochodnych [37,144].

6.2.1. Badania biologiczne

Przeprowadzono wstępne badania aktywności biologicznej kompleksów Cu(HUDP-GluA) i Cu(UDP-GluA)(OH) w warunkach pH 5,0 i 8,0. Analiza otrzymanych danych wykazuje zwiększoną cytotoksyczność związków kompleksowych w porównaniu do wolnego liganda wobec komórek raka płuc linii A549.

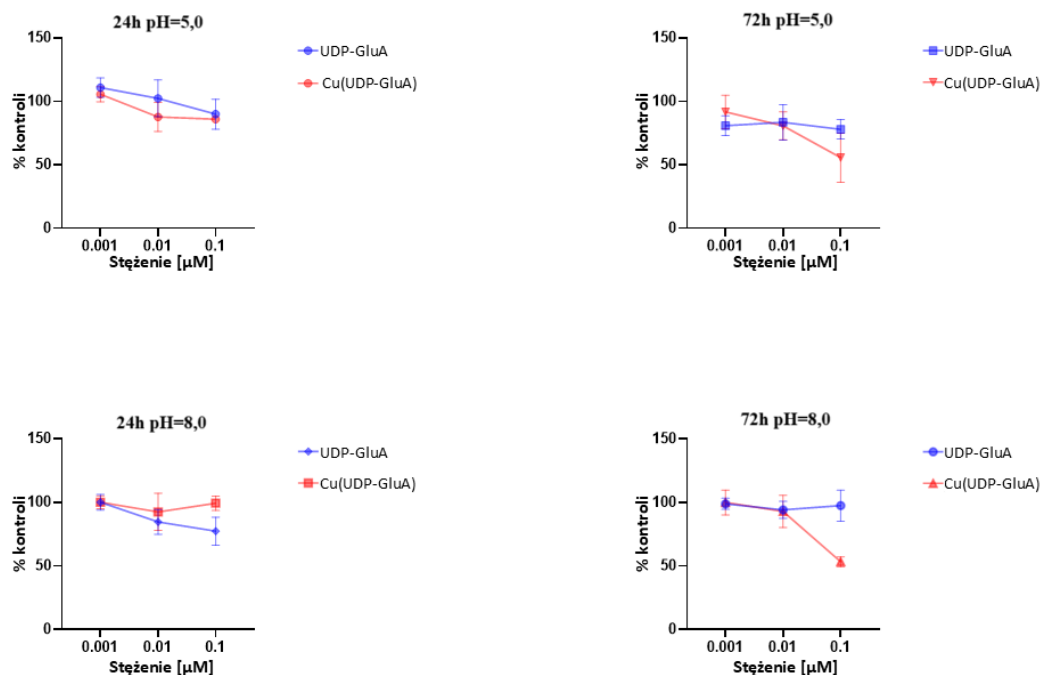
Po 24-godzinnej inkubacji przy pH=5,0 aktywność metaboliczna komórek traktowanych zarówno ligandem, jak i kompleksem Cu(HUDP-GluA) była porównywalna (Rysunek 26), co znajduje odzwierciedlenie w zbliżonych wartościach IC50 (Tabela 20). Jednakże po 72 godzinach wyższą cytotoksyczność można było zaobserwować dla kompleksu Cu(HUDP-GluA). Dla kompleksu Cu(HUDP-GluA) komórki A549 zmniejszyły swoją aktywność metaboliczną o 44,4% w porównaniu do próbki kontrolnej, np. komórek hodowanych w standardowej pożywce wzrostowej.

W warunkach zasadowych, po 72 godzinach inkubacji, ligand UDP-GluA nie wykazał istotnego wpływu na żywotność komórek, co uniemożliwiło wyznaczenie wartości IC50. Natomiast kompleks Cu(UDP-GluA)(OH) wykazał wyraźny efekt cytotoksyczny redukując aktywność metaboliczną komórek linii A549 o 52,2%. Efekt ten był wyraźnie zależny od czasu inkubacji[37].

Tabela 20. Wartości IC50 [μM] obliczone na podstawie wyników testu MTT [37].

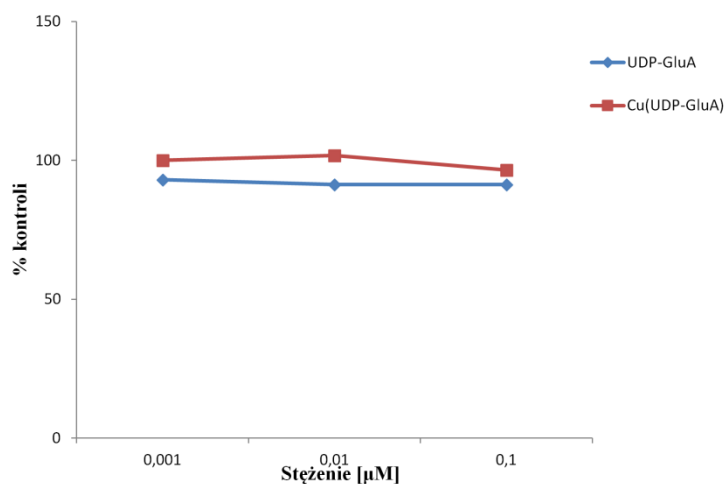
Związek	24 h	72 h
(UDP-GluA) pH=5,0	0,317±0,006	0,781±0,005
Cu(HUDP-GluA) pH=5,0	0,377±0,005	0,116±0,005
(UDP-GluA) pH=8,0	0,295±0,004	n.d.*
Cu(UDP-GluA)(OH) pH=8,0	1,719±0,01	0,094±0,004

*n.d. - niewykrywalny, zbyt niska cytotoksyczność, aby obliczyć IC50.



Rys. 26. Żywotność komórek po inkubacji z badanymi związkami przez 24h i 72h przy różnych wartościach pH [37].

Przeprowadzono również badania cytotoksyczności analizowanego liganda i związku kompleksowego względem linii komórkowych nabłonka urotelialnego (SV HUC1). Analiza otrzymanych wyników wykazała, że badane związki nie wpływają na aktywność metaboliczną komórek nabłonka urotelialnego po upływie 24 h (Rys. 27).



Rys. 27. Żywotność komórek SV HUC 1 po inkubacji z badanymi związkami przez 24h w pH 5,0.

6.3. Jon metalu/urydino-5'-disosfo-N-acetyloglukozamina

W celu zbadania procesu kompleksowania w układzie jon metalu/urydino-5'-difosfo-N-acetyloglukozamina przeprowadzono badania potencjometryczne w stosunkach molowych metalu do liganda wynoszących 1:1 oraz 1:2 dla jonów metali bloku d o znaczeniu biologicznym: jonów miedzi(II), jonów kobaltu(II) oraz jonów niklu(II).

6.3.1. Układ Cu(II)/UDP-GlcNAc

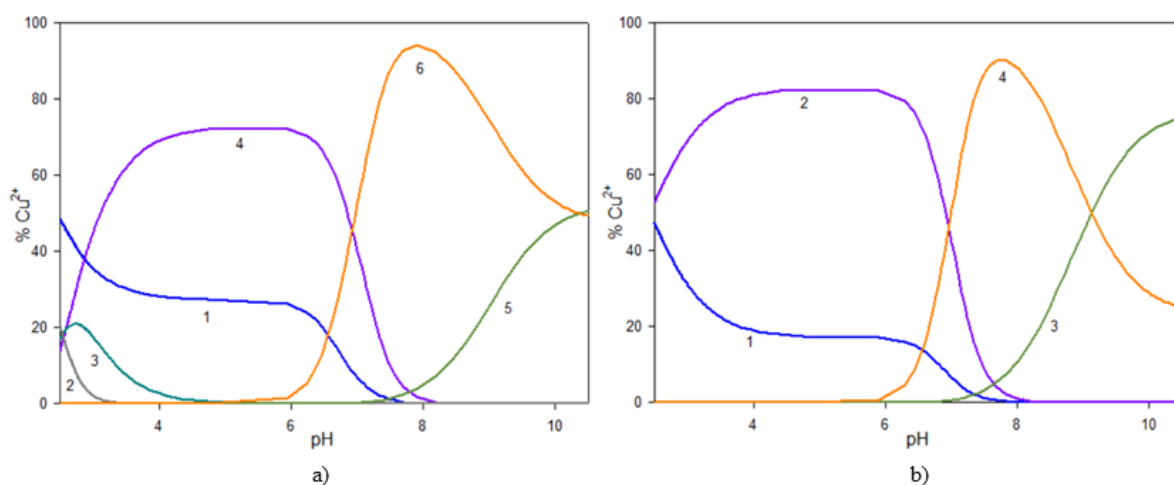
Komputerowa analiza danych otrzymanych z badań potencjometrycznych dla układów w stosunku molowym 1:1 oraz 1:2 wykazała występowanie czterech form kompleksowych: $\text{Cu}(\text{H}_4\text{UDP-GlcNAc})$, $\text{Cu}(\text{H}_2\text{UDP-GlcNAc})$, $\text{Cu}(\text{HUDP-GlcNAc})$ oraz $\text{Cu}(\text{UDP-GlcNAc})(\text{OH})_2$. Dla wszystkich otrzymanych form przeprowadzono pełną charakterystykę termodynamiczną. Uzyskane wartości ogólnych stałych trwałości ($\log\beta$) oraz stałych równowag reakcji tworzenia ($\log K_e$) zestawiono w Tabeli 21. Podczas komputerowej analizy danych wykorzystane wyznaczone stałe protonacji analizowanego liganda oraz stałe hydrolizy, które zaczerpnięte zostały z przeprowadzonych wcześniej badań ($\text{Cu}(\text{OH})_2$ ($\log\beta=-13,13$), $\text{Co}(\text{OH})_2$ ($\log\beta=-17,89$) oraz $\text{Ni}(\text{OH})_2$ ($\log\beta=-17,79$) [139]).

Tabela 21. Ogólne stałe trwałości ($\log\beta$) oraz stałe równowag reakcji tworzenia ($\log K_e$) dla układu Cu(II)/UDP-GlcNAc (odchylenia standardowe podano w nawiasach).

Forma kompleksu	$\log\beta$	$\log K_e$	Reakcja
Cu(H₄UDP-GlcNAc)	21,59(8)	3,41	$\text{Cu}^{2+} + \text{H}_4 \text{UDP-GlcNAc} \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{H}_4\text{UDP-GlcNAc})$
Cu(H₂UDP-GlcNAc)	16,51(9)	2,59	$\text{Cu}(\text{H UDP-GlcNAc}) + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{H}_2\text{UDP-GlcNAc})$
Cu(HUDP-GlcNAc)	13,91(2)	4,30	$\text{Cu}^{2+} + \text{UDP-GlcNAc} \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{UDP-GlcNAc})$
Cu(UDP-GlcNAc)(OH)₂	-9,45(4)	3,96	$\text{Cu}(\text{OH})_2 + \text{UDP-GlcNAc} \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{UDP-GlcNAc})(\text{OH})_2$

Proces kompleksowania w układzie równomolowym, jak i z dwukrotnym nadmiarem liganda rozpoczyna się przy pH poniżej 2,5 (Rys. 28). W układzie 1:1 przy pH około 2,5 występuje forma $\text{Cu}(\text{H}_4\text{UDP-GlcNAc})$, która koordynuje blisko 20% jonów miedzi(II) (Rys. 28a). Przy niskich wartościach pH występuje również forma $\text{Cu}(\text{H}_2\text{UDP-GlcNAc})$, która swoje maksimum osiąga przy pH około 3,0 i wiąże około 20% jonów Cu(II). Przy niskich wartościach pH w układzie z dwukrotnym nadmiarem liganda dominuje kompleks $\text{Cu}(\text{HUDP-GlcNAc})$ (Rys. 28b), który osiąga swoje maksimum w zakresie pH 4,0-6,0, wiążąc ponad 80% jonów miedzi(II). Analogicznie w układzie 1:1 kompleks ten dominuje w tym samym zakresie pH, koordynując około 75% jonów miedzi(II). Przy pH około 8,0 oba układy zdominowane są przez obecność wodorotlenku miedzi(II), który wiąże około 90% wszystkich dostępnych jonów miedzi(II). W układzie 1:2 (nadmiar liganda) kompleks $\text{Cu}(\text{UDP-GlcNAc})(\text{OH})_2$ staje się

dominujący przy pH około 9,0 i w swoim maksimum wiąże ponad 75% jonów Cu(II). W układzie równomolowym forma ta jest dominująca poza zakresem pomiarowym, a przy pH 10,5 koordynuje około 50% jonów miedzi(II).



Rys. 28. Krzywe dystrybucji form dla układów: a) Cu(II)/UDP-GlcNAc 1:1 (1-Cu²⁺, 2-Cu(H₄UDP-GlcNAc), 3-Cu(H₂UDP-GlcNAc), 4-Cu(H(UDP-GlcNAc), 5-Cu(UDP-GlcNAc)(OH)₂, 6-Cu(OH)₂), b) Cu(II)/UDP-GlcNAc 1:2 (1-Cu²⁺, 2-Cu(HUDP-GlcNAc), 3-Cu(UDP-GlcNAc)(OH)₂, 4-Cu(OH)₂).

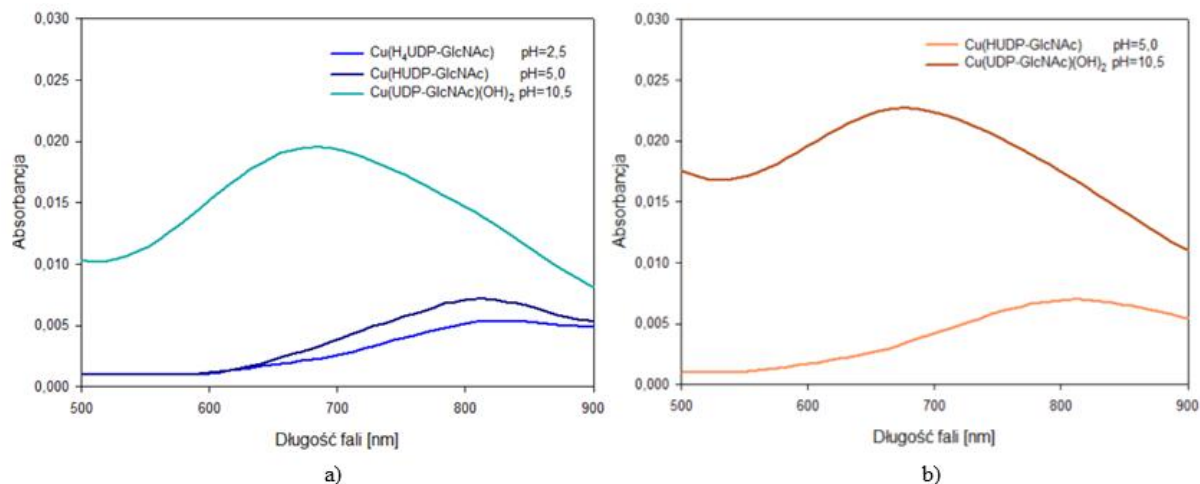
W celu określenia sposobu koordynacji i składu wewnętrznej sfery koordynacyjnej analizowanych związków kompleksowych przeprowadzono serię badań spektroskopowych UV-Vis oraz EPR. Badania spektroskopowe prowadzono dla każdej z wyznaczonych form kompleksowych w stosunkach molowych metalu do liganda 1:1 oraz 1:2. Wszystkie pomiary prowadzono w pH dominacji form kompleksowych, które wyznaczono na podstawie analizy widm dystrybucji. Otrzymane parametry spektroskopowe UV-Vis zestawiono w Tabeli 22.

Tabela 22. Parametry spektroskopowe UV-Vis dla kompleksów tworzących się w układzie jony miedzi(II)/UDP-GlcNAc.

	Forma kompleksu	pH	$\lambda_{\max}$ [nm]	ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹]
1:1	Cu(H ₄ UDP-GlcNAc)	2,5	825	10
	Cu(H ₂ UDP-GlcNAc)	3,0	-	-
	Cu(HUDP-GlcNAc)	5,0	810	14
	Cu(UDP-GlcNAc)(OH) ₂	10,5	685	39
1:2	Cu(HUDP-GlcNAc)	5,0	810	14
	Cu(UDP-GlcNAc)(OH) ₂	10,5	676	46

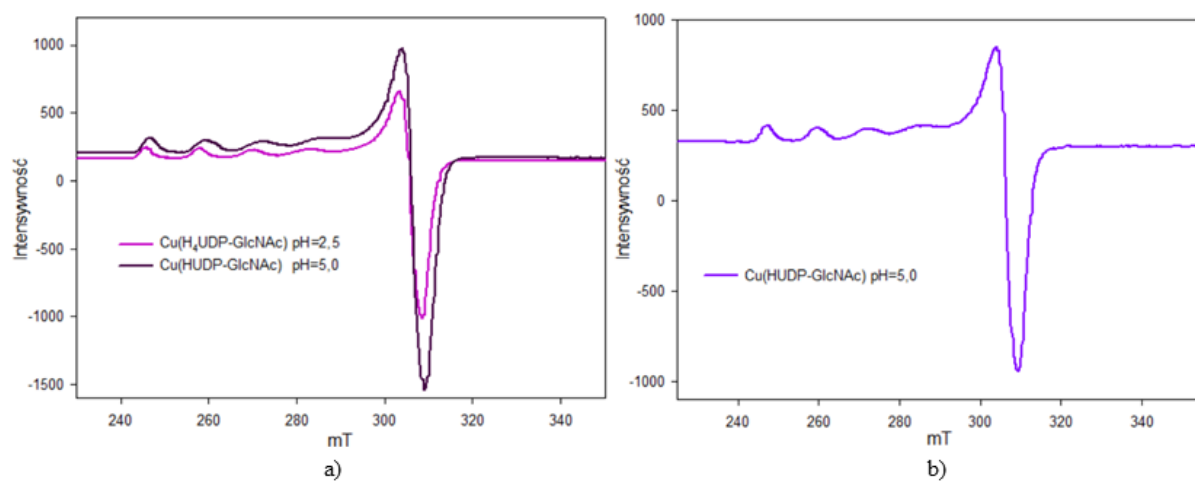
Zaobserwowane przesunięcia pasm absorpcyjnych potwierdzają zmiany w strukturze wewnętrznej sfery koordynacyjnej metali (Rysunek 29). W przypadku układów Cu(II)/UDP-GlcNAc zaobserwowano efekt hipsochromowy wraz ze wzrostem pH – świadczy to o przejściu

z kompleksów zawierających bardziej zprotonowane ligandy do form z wiązaniami poprzez deprotonowane grupy fosforanowe ($-O-PO_3H$) oraz atomu azotu z grupy $-N(3)H$ z cząsteczki urydyno-5'-difosforanu. Szczególne znaczenie ma obecność pasm w okolicach 810 nm ($Cu(HL)$) i przesunięcie ich do 685–676 nm dla $CuL(OH)_2$ w zasadowym pH.



Rys. 29. Widmo spektroskopowe UV-Vis dla układu $Cu(II)/UDP-GlcNAc$: a) w stosunku molowym 1:1, b) w stosunku molowym 1:2.

Badania spektroskopowe EPR potwierdziły obecność wyłącznie form monomerycznych w układach zawierających jony miedzi(II), a uzyskane widma są charakterystyczne dla związków zawierających w swojej strukturze jony Cu^{2+} (Rys. 34). W przypadku układu równowagowego tworzenie wiązań koordynacyjnych w kompleksach $Cu(H_4UDP-GlcNAc)$ ($g_{II}=2,40$ i $A_{II}=137 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$) oraz $Cu(HUDP-GlcNAc)$ ($g_{II}=2,39$ i $A_{II}=144 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$) zachodzi prawdopodobnie za pośrednictwem jednego atomu tlenu z grupy $-O-PO_3H$ (Rys. 30a). W przypadku układu 1:2 wartości parametrów ($g_{II} = 2,38$; $A_{II} = 141 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$) są bardzo zbliżone, co sugeruje, że sposób koordynacji nie zmienia się znacząco mimo nadmiaru liganda (Rys. 30b). Nie było możliwe przeprowadzenie badań EPR dla kompleksów $Cu(H_2UDP-GlcNAc)$ oraz $Cu(UDP-GlcNAc)(OH)_2$ z uwagi na obecność osadu w przygotowanych próbkach.



Rys. 30. Widma spektroskopowe EPR dla układu $\text{Cu}(\text{II})/\text{UDP-GlcNAc}$: a) w stosunku molowym 1:1, b) w stosunku molowym 1:2.

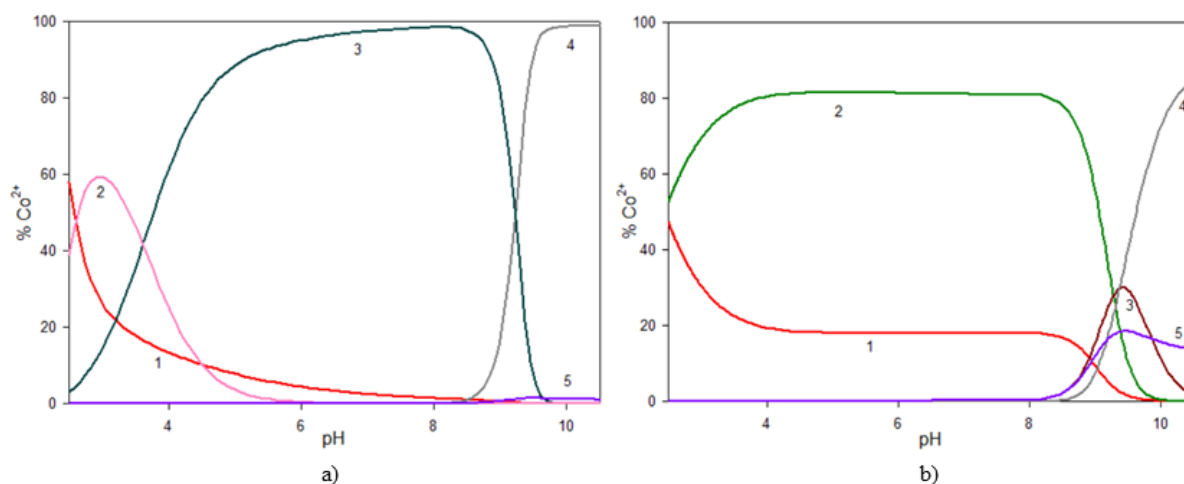
6.3.2. Układ Co(II)/UDP-GlcNAc

Komputerowa analiza danych uzyskanych z przeprowadzonych badań potencjometrycznych wykazała występowanie pięciu form kompleksowych: $\text{Co(UDP-GlcNAc)(OH)}_2$, Co(UDP-GlcNAc)_2 , Co(HUDP-GlcNAc)_2 , $\text{Co}_2(\text{UDP-GlcNAc})_2\text{H}$ oraz $\text{Co}_2(\text{UDP-GlcNAc})_2\text{H}_2$. W przeciwieństwie do układów z jonami miedzi(II) oraz niklu(II), zaobserwowano występowanie form dimerycznych. Uzyskane dane potencjometryczne zestawiono w Tabeli 23.

Tabela 23. Ogólne stałe trwałości ($\log\beta$) oraz stałe równowag tworzenia ($\log K_e$) dla układu Co(II)/UDP-GlcNAc (odchylenia standardowe podano w nawiasach).

Forma kompleksu	$\log\beta$	$\log K_e$	Reakcja
$\text{Co}_2(\text{HUDP-GlcNAc})_2$	31,83(7)	3,61	$\text{Co}_2(\text{UDP-GlcNAc})_2\text{H} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Co}_2(\text{HUDP-GlcNAc})_2$
$\text{Co}_2(\text{HUDP-GlcNAc})(\text{UDP-GlcNAc})$	28,22(9)	18,60	$2 \text{Co}^{2+} + (\text{HUDP-GlcNAc}) + \text{UDP-GlcNAc} \rightleftharpoons \text{Co}_2(\text{HUDP-GlcNAc})(\text{UDP-GlcNAc})$
Co(HUDP-GlcNAc)_2	27,44	8,21	$\text{Co} + 2 \text{HUDP-GlcNAc} \rightleftharpoons \text{Co(HUDP-GlcNAc)}_2$
Co(UDP-GlcNAc)_2	8,88	8,88	$\text{Co} + 2 \text{UDP-GlcNAc} \rightleftharpoons \text{Co(UDP-GlcNAc)}_2$
$\text{Co(UDP-GlcNAc)(OH)}_2$	-12,19(5)	5,70	$\text{Co(OH)}_2 + \text{UDP-GlcNAc} \rightleftharpoons \text{Co(UDP-GlcNAc)(OH)}_2$

Proces kompleksowania w obu badanych układach rozpoczyna się poza analizowanym zakresem pH (Rys. 31). W układzie równomolowym zaobserwowano obecność form dimerycznych (Rys. 31a). Kompleks $\text{Co}_2(\text{HUDP-GlcNAc})_2$ kompleksuje blisko 60% jonów kobaltu(II) przy pH około 3,0. W zakresie pH 4,0-8,5 dominującą formą jest $\text{Co}_2(\text{HUDP-GlcNAc})(\text{UDP-GlcNAc})$, wiążąc niemal 100% jonów Co(II) przy pH około 8,0. W układzie z dwukrotnym nadmiarem liganda pierwszą powstającą formą kompleksową jest Co(HUDP-GlcNAc)_2 (Rys. 31b). Związek ten jest obecny w roztworze do pH około 9,5, osiągając swoje maksimum w zakresie pH 4,0-8,5, gdzie wiąże około 80% jonów Co(II). Od pH około 8,0 w układzie tym obecna jest również forma Co(UDP-GlcNAc)_2 , która przy pH 9,5 koordynuje około 35% jonów kobaltu(II), lecz nie osiąga dominacji. Powyżej pH 9,5 w obu układach formą dominującą jest $\text{Co(UDP-GlcNAc)(OH)}_2$, która koordynuje odpowiednio około 100% (dla układu 1:1) i 80% (dla układu 1:2) dostępnych jonów kobaltu(II).



Rys. 31. Krzywe dystrybucji form dla układów: a) Co(II)/UDP-GlcNAc 1:1 (1- Co^{2+} , 2- $\text{Co}_2(\text{HUdp-GlcNAc})_2$, 3- $\text{Co}_2(\text{HUdp-GlcNAc})(\text{UDP-GlcNAc})$, 4- $\text{Co}(\text{UDP-GlcNAc})(\text{OH})_2$, 5- $\text{Co}(\text{OH})_2$) b) Co(II)/UDP-GlcNAc 1:2 (1- Co^{2+} , 2- $\text{Co}(\text{HUdp-GlcNAc})_2$, 3- $\text{Co}(\text{UDP-GlcNAc})_2$, 4- $\text{Co}(\text{UDP-GlcNAc})(\text{OH})_2$, 5- $\text{Co}(\text{OH})_2$).

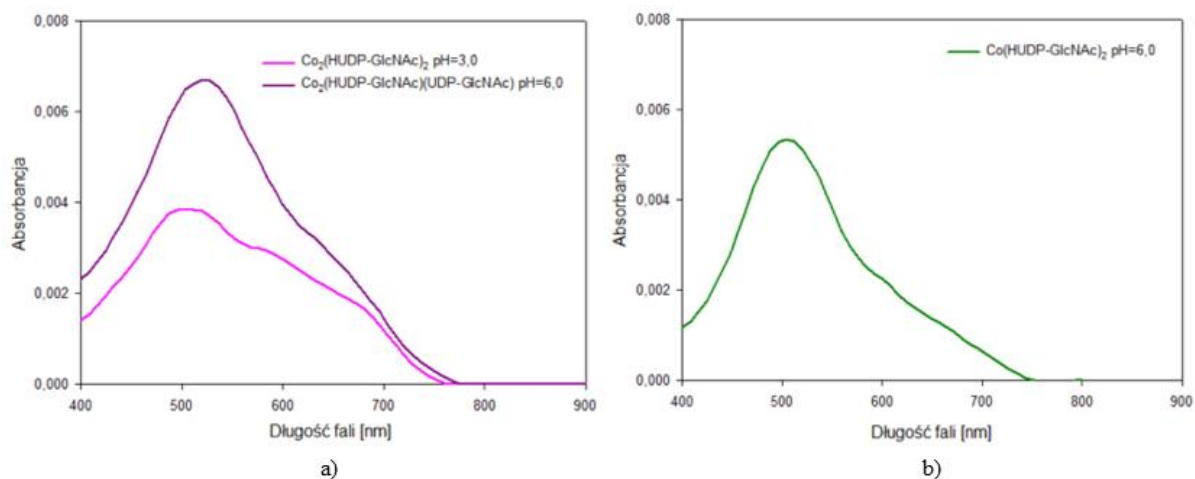
W celu określenia sposobu koordynacji i składu wewnętrznej sfery koordynacyjnej analizowanych związków kompleksowych przeprowadzono serię badań spektroskopowych UV-Vis. Badania prowadzono w pH dominacji form kompleksowych, które wyznaczono na podstawie analizy widm dystrybucji. Otrzymane parametry spektroskopowe zestawiono w Tabeli 24.

Tabela 24. Parametry spektroskopowe UV-Vis dla kompleksów tworzących się w układzie jony kobaltu(II)/UDP-GlcNAc.

	Forma kompleksu	pH	λ_{max} [nm]	ϵ [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$]
1:1	$\text{Co}_2(\text{HUdp-GlcNAc})_2$	3,0	505	8
	$\text{Co}_2(\text{HUdp-GlcNAc})(\text{UDP-GlcNAc})$	6,0	520	13
	$\text{Co}(\text{UDP-GlcNAc})(\text{OH})_2$	10,5	-	-
1:2	$\text{Co}(\text{HUdp-GlcNAc})_2$	6,0	504	11
	$\text{Co}(\text{UDP-GlcNAc})_2$	9,0	-	-
	$\text{Co}(\text{UDP-GlcNAc})(\text{OH})_2$	10,5	-	-

W układach zawierających jony kobaltu(II) (Rys. 32) zaobserwowano nieznaczny efekt batochromowe dla układu w stosunku molowym 1:1 (Rys. 32a). Świadczy to o zmianach wewnętrznej sfery koordynacyjnej między formami $\text{Co}_2(\text{HUdp-GlcNAc})_2$ oraz $\text{Co}_2(\text{HUdp-GlcNAc})(\text{UDP-GlcNAc})$ i dołączeniu kolejnego atomu tlenu reszty fosforanowej ($-\text{O-PO}_3\text{H}$) do sfery koordynacyjnej drugiego z kompleksów. W układzie z dwukrotnym nadmiarem liganda (Rys. 32b) zarejestrowano widmo dla kompleksu $\text{Co}(\text{UDP-GlcNAc})_2$. Na podstawie uzyskanych parametrów spektroskopowych można stwierdzić, że atom tlenu jednej

z reszt fosforanowych wchodzi w skład wewnętrznej sfery koordynacyjnej. Niemożliwe jest zarejestrowanie widm dla kompleksu $\text{Co(UDP-GlcNAc)(OH)}_2$, w obu stosunkach molowych, oraz dla kompleksu Co(HUDP-GlcNAc)_2 z uwagi na obecność osadu w przygotowanych próbkach.



Rys. 32. Widmo UV-Vis dla układu Co(II)/UDP-GlcNAc : a) w stosunku molowym 1:1, b) w stosunku molowym 1:2.

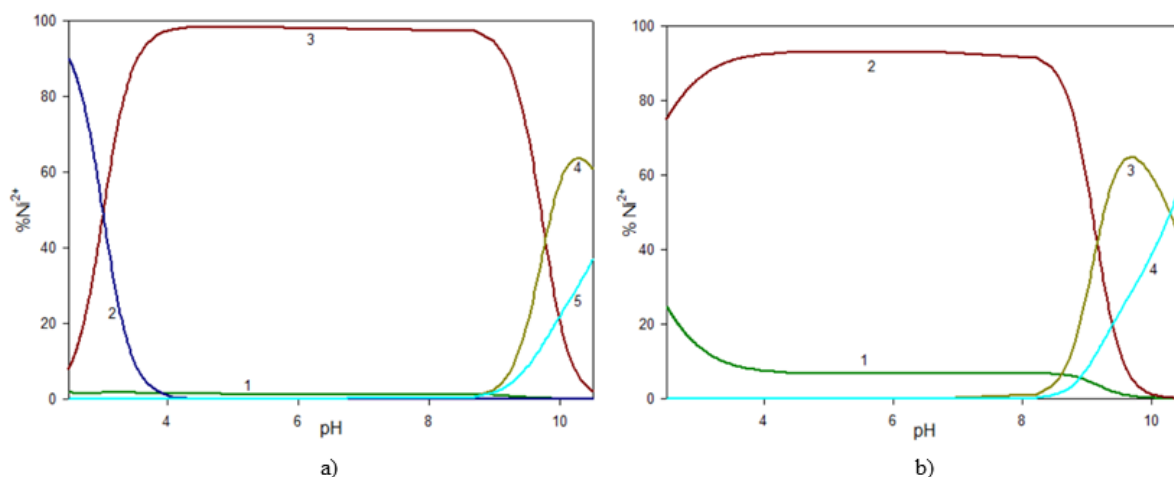
6.3.3. Układ Ni(II)/UDP-GlcNAc

Komputerowa analiza danych uzyskanych z badań potencjometrycznych pozwoliła na wyznaczenie trzech form kompleksowych: $\text{Ni}(\text{H}_3\text{UDP-GlcNAc})$, $\text{Ni}(\text{HUDP-GlcNAc})$ oraz $\text{Ni}(\text{UDP-GlcNAc})(\text{OH})$. Na podstawie otrzymanych wyników wyznaczono ogólne stałe trwałości ($\log\beta$) oraz stałe równowag tworzenia ($\log K_e$) dla każdej z wyznaczonych form kompleksowych. Dane zestawiono w Tabeli 25.

Tabela 25. Ogólne stałe trwałości ($\log\beta$) oraz stałe równowag reakcji tworzenia ($\log K_e$) dla układu Ni(II)/UDP-GlcNAc (odchylenia standardowe podano w nawiasach).

Forma kompleksu	$\log\beta$	$\log K_e$	Reakcja
$\text{Ni}(\text{H}_3\text{UDP-GlcNAc})$	22,33	9,55	$\text{Ni}^{2+} + (\text{H}_2\text{UDP-GlcNAc}) + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Ni}(\text{H}_3\text{UDP-GlcNAc})$
$\text{Ni}(\text{HUDP-GlcNAc})$	15,16(5)	5,55	$\text{Ni}^{2+} + \text{HUDP-GlcNAc} \rightleftharpoons \text{Ni}(\text{HUDP-GlcNAc})$
$\text{Ni}(\text{UDP-GlcNAc})(\text{OH})$	-3,77(5)	9,99	$\text{Ni}^{2+} + \text{UDP-GlcNAc} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Ni}(\text{UDP-GlcNAc})(\text{OH})_2$

W obu analizowanych układach (1:1 i 1:2), proces kompleksowania rozpoczyna się poniżej pH 2,5 (Rys. 33). W układzie równomolowym pierwszym powstającym kompleksem jest $\text{Ni}(\text{H}_3\text{UDP-GlcNAc})$ (Rys. 33a). Kompleks ten jest obecny w układzie do pH około 4,0. Przy pH 2,5 kompleksuje on blisko 90% jonów niklu(II) obecnych w roztworze. W całym analizowanym zakresie pH obecna w układzie jest forma $\text{Ni}(\text{HUDP-GlcNAc})$, która dominuje w przedziale pH 4,0-8,5, kompleksując ponad 95% jonów Ni(II). W układzie z dwukrotnym nadmiarem liganda poniżej pH 7,0 obecna jest wyłącznie forma $\text{Ni}(\text{HUDP-GlcNAc})$ (Rys. 33b). Proces jej tworzenia rozpoczyna się poniżej badanego zakresu pH, a swoje maksimum osiąga ona w przedziale pH 4,0-8,5, kompleksując około 90% jonów Ni(II). W obu stosunkach molowych przy pH około 10,0 dominującą formą jest hydroksokompleks, $\text{Ni}(\text{UDP-GlcNAc})(\text{OH})$, który koordynuje około 65% jonów niklu(II). Przy wyższych wartościach pH obserwuje się również występowanie wodorotlenku niklu(II). W układzie 1:1 $\text{Ni}(\text{OH})_2$ swoje maksimum osiąga poza badanym zakresem, a przy pH 10,5 wiąże ponad 35% jonów Ni(II). Natomiast w układzie 1:2 związek ten przy tym samym pH wiąże prawie 60% jonów niklu(II).



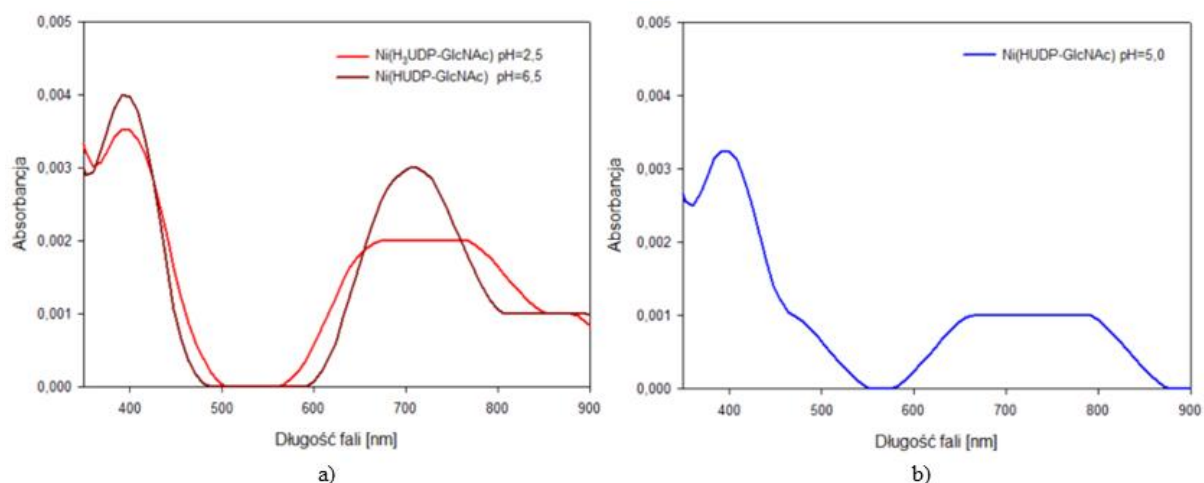
Rys. 33. Krzywe dystrybucji form dla układów: a) Ni(II)/UDP-GlcNAc 1:1 (1- Ni^{2+} , 2- $\text{Ni}(\text{H}_3\text{UDP-GlcNAc})$, 3- $\text{Ni}(\text{HUDP-GlcNAc})$, 4- $\text{Ni}(\text{UDP-GlcNAc})(\text{OH})$, 5- $\text{Ni}(\text{OH})_2$) b) Ni(II)/UDP-GlcNAc 1:2 (1- Ni^{2+} , 2- $\text{Ni}(\text{HUDP-GlcNAc})$, 3- $\text{Ni}(\text{UDP-GlcNAc})(\text{OH})$, 4- $\text{Ni}(\text{OH})_2$).

W celu określenia sposobu koordynacji i składu wewnętrznej sfery koordynacyjnej analizowanych związków kompleksowych przeprowadzono serię badań spektroskopowych UV-Vis. Badania prowadzono przy pH dominacji form kompleksowych, które wyznaczono na podstawie analizy widm dystrybucji. Otrzymane parametry spektroskopowe zestawiono w Tabeli 26.

Tabela 26. Parametry spektroskopowe UV-Vis dla kompleksów tworzących się w układzie jony niklu(II)/UDP-GlcNAc.

	Forma kompleksu	pH	λ_{max} [nm]	ϵ [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$]
1:1	$\text{Ni}(\text{H}_3\text{UDP-GlcNAc})$	2,5	395	7
	$\text{Ni}(\text{HUDP-GlcNAc})$	6,5	391	8
	$\text{Ni}(\text{UDP-GlcNAc})(\text{OH})$	10,0	-	-
1:2	$\text{Ni}(\text{HUDP-GlcNAc})$	5,0	392	6
	$\text{Ni}(\text{UDP-GlcNAc})(\text{OH})$	9,5	-	-

Niewielkie przesunięcie hipsochromowe zaobserwowano w układach zawierających jony niklu(II). Analiza uzyskanych widm wykazała zmiany absorbancji w zakresie długości fal 600-800 nm oraz przy długości fali około 400 nm (Rys. 34). Zaobserwowany efekt jest charakterystyczny dla zmian zachodzących w wewnętrznej sferze koordynacyjnej jonów niklu(II) wraz ze wzrostem wartości pH układu. [139]. Nie udało się zarejestrować widm spektroskopowych UV-Vis dla kompleksów $\text{Ni}(\text{UDP-GlcNAc})(\text{OH})$, w obu stosunkach molowych ze względu na obecność osadu w przygotowanych układach pomiarowych.



Rys. 34. Widmo spektroskopowe UV-Vis dla układu Ni(II)/UDP-GlcNAc: a) w stosunku molowym 1:1, b) w stosunku molowym 1:2.

Przy niskich wartościach pH wewnętrzna sfera koordynacyjna badanych związków kompleksowych zawiera atomy tlenu grup fosforanowych ($-O-PO_3H$) liganda. Wraz ze wzrostem pH, atom azotu grupy ($-N(3)H$) z pierścienia urydyny jest włączany do wewnętrznej sfery koordynacyjnej. Różnice parametrów spektralnych, które otrzymane zostały dla analogicznych form kompleksowych wynikały z różnic w procentowym udziale jonów metali w tworzeniu związków kompleksowych.

6.3.4. Porównanie wyników badań dla układów jon metalu(II)/UDP-GlcNAc

Przeprowadzono badania potencjometryczne i spektroskopowe UV-Vis oraz EPR dla układów podwójnych: jony miedzi(II)/UDP-GlcNAc, jony kobaltu(II)/UDP-GlcNAc oraz jony niklu(II)/UDP-GlcNAc.

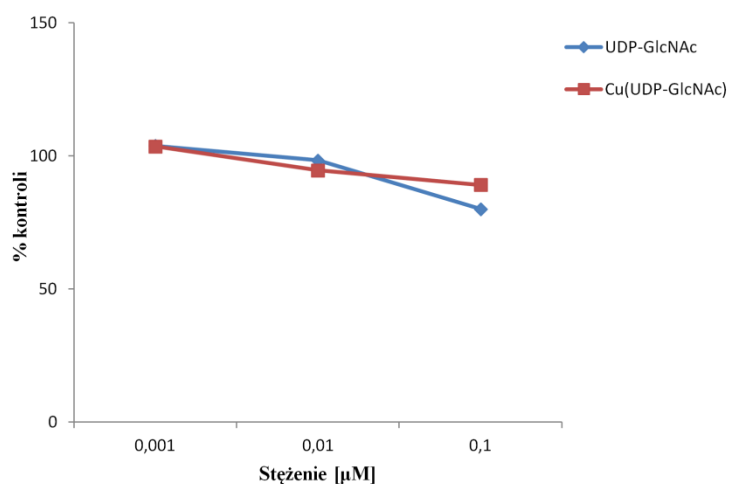
Analiza otrzymanych wyników potencjometrycznych pozwoliła na wyznaczenie form kompleksowych, które występują w badanych układach oraz wyznaczenie ich ogólnych stałych trwałości ($\log\beta$) i stałych równowag reakcji tworzenia ($\log K_e$). W układach zawierających jony miedzi(II) i niklu(II) zaobserwowano występowanie protonowanych form kompleksowych typu $M(H_x\text{UDP-GlcNAc})$ oraz hydroksokompleksów typu $M(\text{UDP-GlcNAc})(OH)_x$. Kompleks $M(\text{HUdp-GlcNAc})$ tworzy się w obu układach, a otrzymane wartości ogólnych stałych trwałości ($\text{Cu}(\text{HUdp-GlcNAc})$: $\log\beta=13,91$; $\text{Ni}(\text{HUdp-GlcNAc})$: $\log\beta=15,16$) wskazują na większą stabilność tej formy w układzie zawierającym jony niklu(II). W układach zawierających jony kobaltu(II) nie zaobserwowano występowania prostych oraz protonowanych form liganda. W układach tych zaobserwowano występowanie form dimerycznych typu $M_2(\text{HUdp-GlcNAc})_x$ oraz $M_2(\text{HUdp-GlcNAc})(\text{UDP-GlcNAc})$, a także form $M(\text{HUdp-GlcNAc})_x$, $M(\text{UDP-GlcNAc})_x$, $M(\text{UDP-GlcNAc})(OH)_x$. Kompleks $M(\text{UDP-GlcNAc})(OH)_2$ tworzy się w układach zawierających jony kobaltu(II) oraz jony miedzi(II), przy czym większą stabilnością termodynamiczną cechuje się forma $\text{Cu}(\text{UDP-GlcNAc})(OH)_2$.

Przeprowadzone badania spektroskopowe UV-Vis oraz EPR umożliwiły określenie składu wewnętrznej sfery koordynacyjnej badanych związków kompleksowych. Przy niskich wartościach pH wewnętrzna sfera koordynacyjna badanych związków kompleksowych zawiera atomy tlenu grup fosforanowych ($-O-PO_3H$) liganda. Wraz ze wzrostem pH, atom azotu grupy $-N(3)H$ z pierścienia urydyny jest włączany do wewnętrznej sfery koordynacyjnej.

6.3.5. Badania biologiczne

Przeprowadzono wstępne badania biologiczne dla kompleksu Cu(HUDP-GlcNAc), w warunkach pH odpowiadających dominacji tej formy (pH = 5,0), przy stosunku molowym metal:ligand 1:1.. Analiza danych otrzymanych po 24 h inkubacji wykazała, że kompleks ten nie wykazuje istotnie wyższej cytotoksyczności względem wolnego liganda komórkowych stosunku do komórek nowotworowych linii T24 (rak pęcherza moczowego).

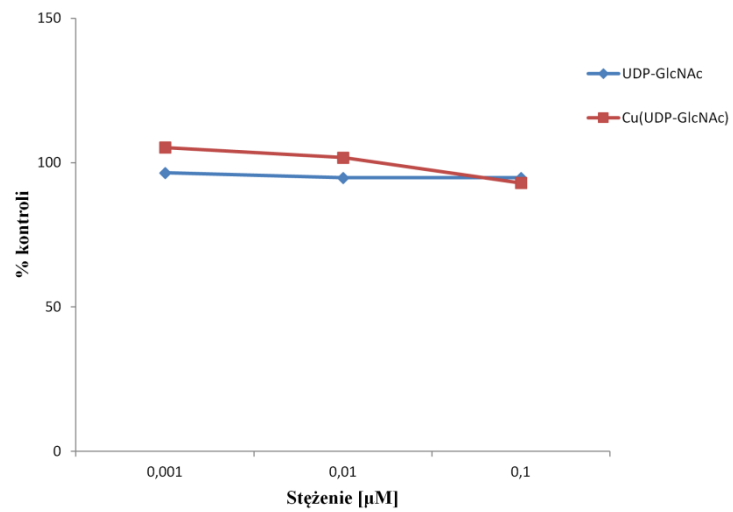
Aktywność metaboliczna komórek, oceniana za pomocą testu MTT, była zbliżona w obu przypadkach, co przedstawiono na Rysunku 35.



Rys. 35. Żywotność komórek T24 po 24-godzinnej inkubacji z badanymi związkami (pH=5,0).

Aktywność metaboliczna komórek T24 zmalała odpowiednio o 23,7% dla UDP-GlcNAc oraz o 14,4% dla Cu(HUDP-GlcNAc). Uzyskane wyniki mogą świadczyć o silnej zależności cytotoksyczności badanego związku kompleksowego od czasu trwania inkubacji.

W celu określenia selektywności cytotoksycznej, przeprowadzono również badania z wykorzystaniem linii SV HUC-1 (komórki nabłonka urotelialnego – zdrowe komórki pęcherza). Otrzymane wyniki wskazują, że zarówno ligand UDP-GlcNAc, jak i kompleks Cu(HUDP-GlcNAc), nie wpływają istotnie na aktywność metaboliczną tych komórek. Wyniki przedstawiono na Rysunku 36.



Rys. 36. Żywotność komórek SV HUC1 po 24-godzinnej inkubacji z badanymi związkami (pH=5,0).

6.4. Jon metalu/urydyno-5'-difosfoglukoza

W celu analizy procesu kompleksowania w układzie jon metalu/urydyno-5'-difosfoglukoza przeprowadzono szereg badań potencjometrycznych. Badania wykonano dla stosunków molowych metalu do liganda wynoszących 1:1 oraz 1:2 z wykorzystaniem jonów metali bloku d o znaczeniu biologicznym: miedzi(II), kobaltu(II) oraz niklu(II).

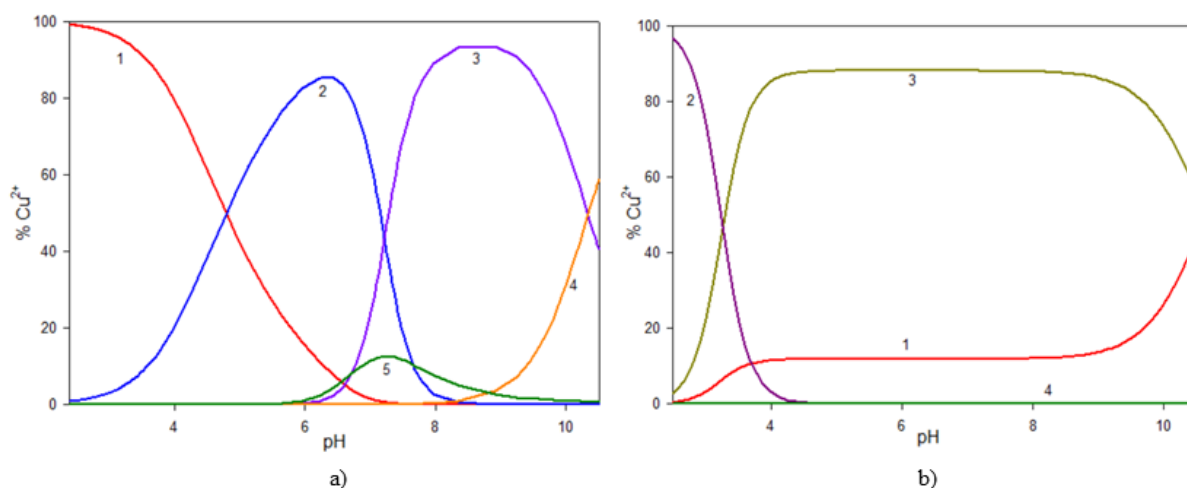
6.4.1. Układ Cu(II)/UDP-Glc

Analiza danych otrzymanych z przeprowadzonych badań potencjometrycznych wykazała występowanie pięciu form kompleksowych: Cu(H₃UDP-Glc), Cu(HUDP-Glc), Cu(UDP-Glc), Cu(UDP-Glc)(OH)₂ oraz Cu(UDP-Glc)(OH)₃. W Tabeli 27 zestawiono wartości ogólnych stałych trwałości (logβ) oraz stały równowag reakcji tworzenia (logK_e) dla poszczególnych form kompleksowych.

Tabela 27. Ogólne stałe trwałości (logβ) oraz stałe równowag tworzenia (logK_e) dla układu Ni(II)/UDP-Glc (odchylenia standardowe podano w nawiasach).

Forma kompleksu	logβ	logK _e	Reakcja
Cu(H₃UDP-Glc)	20,35(5)	6,54	Cu(HUDP-Glc) + 2 H ⁺ ⇌ Cu(H ₃ UDP-Glc)
Cu(HUDP-Glc)	13,81(4)	4,12	Cu ²⁺ + HUDP-Glc ⇌ Cu(HUDP-Glc)
Cu(UDP-Glc)	8,50(5)	8,50	Cu ²⁺ + UDP-Glc ⇌ CuUDP-Glc
Cu(UDP-Glc)(OH)₂	-5,93(7)	7,20	Cu(OH) ₂ + UDP-Glc ⇌ CuUDP-Glc(OH) ₂
Cu(UDP-Glc)(OH)₃	-16,27(9)	3,43	Cu(UDP-Glc)(OH) ₂ + H ₂ O ⇌ Cu(UDP-Glc)(OH) ₃

W układzie równomolowym proces kompleksowania rozpoczyna się przy pH około 2,5 od tworzenia prostego kompleksu Cu(UDP-Glc). Forma ta swoje maksimum osiąga przy pH około 6,0 i wiąże około 85% jonów miedzi(II) obecnych w roztworze (Rys. 37a). W przeciwieństwie do układu 1:1, proces kompleksowania w układzie z dwukrotnym nadmiarem liganda rozpoczyna się poza analizowanym zakresem pH od tworzenia kompleksu Cu(H₃UDP-Glc) (Rys. 37b). Związek ten przy pH 2,5 koordynując około 95% jonów Cu(II). Od pH około 3,0 w układzie formą dominującą jest kompleks Cu(HUDP-Glc), który jest obecny w całym analizowanym zakresie pH. W przedziale pH 4,0-9,0 kompleksuje on około 85% jonów Cu(II). W układzie równomolowym od pH około 7,0 dominuje pierwszy z hydroksokompleksów, Cu(UDP-Glc)(OH)₂, który swoje maksimum osiąga przy pH około 8,5 i wiąże blisko 95% jonów miedzi(II). Kompleks Cu(UDP-Glc)(OH)₃ swoje maksimum osiąga poza analizowanym zakresem pH, a przy pH około 10,5 koordynuje około 60% jonów Cu(II) obecnych w roztworze.



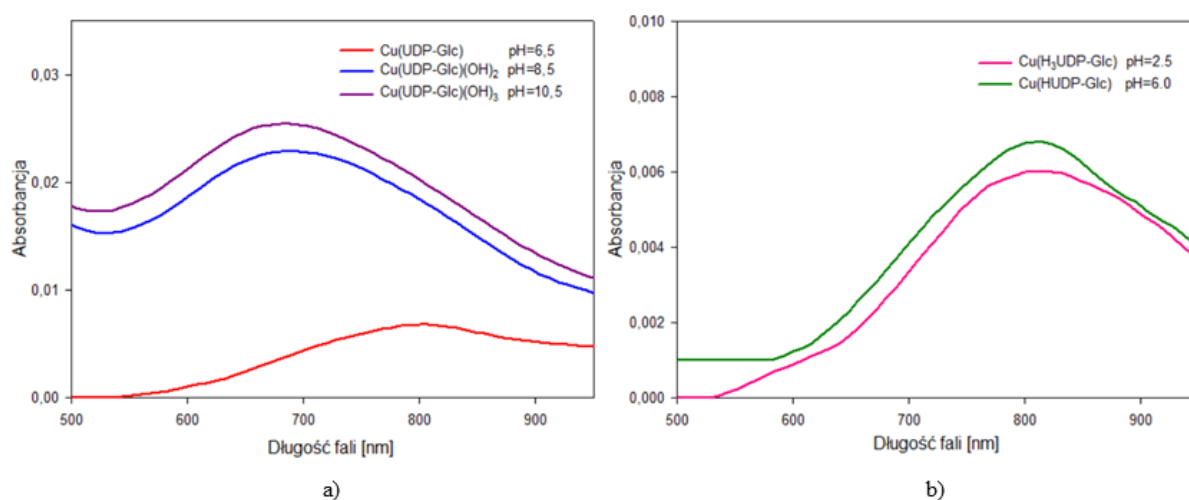
Rys. 37 . Krzywe dystrybucji form dla układów: a) Cu(II)/UDP-Glc 1:1 (1-Cu²⁺, 2-Cu(UDP-Glc), 3-Cu(UDP-Glc)(OH)₂, 4-Cu(UDP-Glc)(OH)₃, 5-Cu(OH)₂); b) Cu(II)/UDP-Glc 1:2 (1-Cu²⁺, 2-Cu(H₃UDP-Glc), 3-Cu(HUDP-Glc), 4-Cu(OH)₂).

Powstawanie związków kompleksowych w układach zawierających jony miedzi(II) zostało potwierdzone przy użyciu technik spektroskopowych (UV-Vis oraz EPR). Pomiary wykonano dla próbek przy wartościach pH, odpowiadających maksymalnemu udziałowi dominujących form kompleksowych. Dane spektralne uzyskane dla badanych kompleksów zestawiono w Tabeli 28.

Tabela 28. Parametry spektralne UV-Vis dla układu jony miedzi(II)/UDP-Glc.

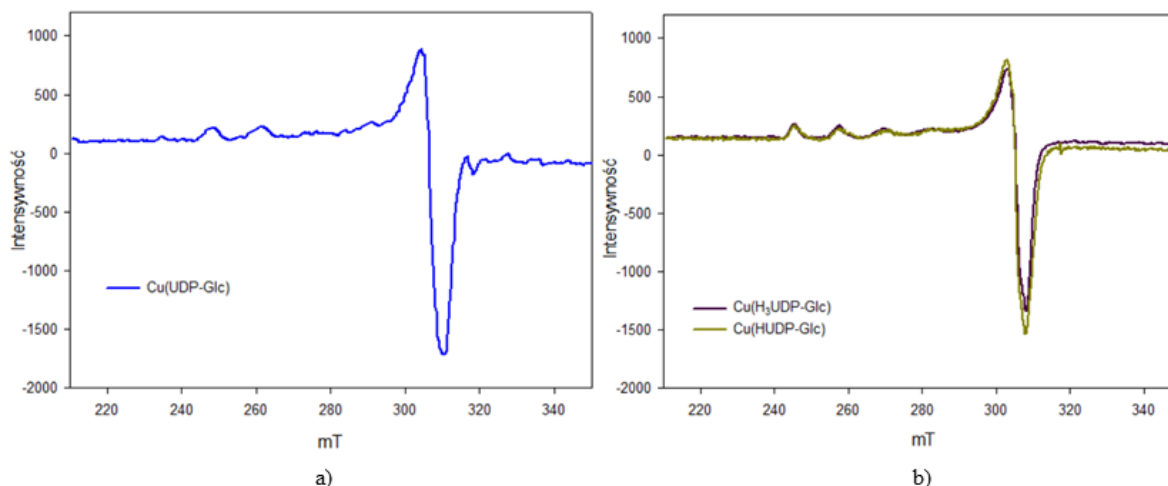
	Forma kompleksu	pH	$\lambda_{\max}$ [nm]	ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹]
1:1	Cu(UDP-Glc)	6,5	802	14
	Cu(UDP-Glc)(OH) ₂	8,5	700	46
	Cu(UDP-Glc)(OH) ₃	10,5	690	52
1:2	Cu(H ₃ UDP-Glc)	2,5	815	12
	Cu(HUDP-Glc)	6,0	805	14

W układach zawierających jony miedzi(II) zaobserwowano przesunięcie pasm absorpcji w kierunku krótszych długości fal (efekt hipsochromowy) wraz ze wzrostem wartości pH, co wskazuje na zmianę w wewnętrznej sferze koordynacyjnej jonów metalu (Rysunek 38). Zaobserwowane przesunięcia są wynikiem włączenia dodatkowych atomów donorowych, takich jak atom tlenu z grupy fosforanowej (-O-PO₃H), a przy wyższych wartościach pH także atomu azotu z grupy (-N(3)H) cząsteczki urydyno-5'-difosforanu.



Rys. 38. Widmo spektroskopowe UV-Vis dla układu Cu(II)/UDP-Glc: a) w stosunku molowym 1:1, b) w stosunku molowym 1:2.

Badania spektroskopowe EPR potwierdziły obecność wyłącznie form monomerycznych w układach zawierających jony miedzi(II). Uzyskane widma są charakterystyczne dla związków zawierających w swojej strukturze jony Cu(II) (Rys. 39). W przypadku układu równowagowego tworzenie wiązań koordynacyjnych w kompleksie Cu(UDP-Glc) ($g_{II}=2,40$ i $A_{II}=138 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$) zachodzi prawdopodobnie za pośrednictwem jednego atomu tlenu z grupy fosforanowej ($-\text{O}-\text{PO}_3\text{H}$) (Rys. 39a). Niewielkie różnice parametrów spektroskopowych dla kompleksów: Cu($\text{H}_3\text{UDP-Glc}$) - $g_{II}=2,41$ i $A_{II}=136 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ oraz Cu(HUDP-Glc) - $g_{II}=2,40$ i $A_{II}=138 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, sugerują podobny typ koordynacji również z udziałem grupy fosforanowej (Rys. 39b). Niewielkie różnice w parametrach g i A wskazują, że typ donorów oraz geometria koordynacyjna nie ulega znacznym zmianom. Warto zaznaczyć, że dla form zasadowych nie uzyskano widm EPR, co było spowodowane obecnością osadu w przygotowanych próbkach.



Rys. 39. Widma spektroskopowe EPR dla układu Cu(II)/UDP-Glc: a) w stosunku molowym 1:1, b) w stosunku molowym 1:2.

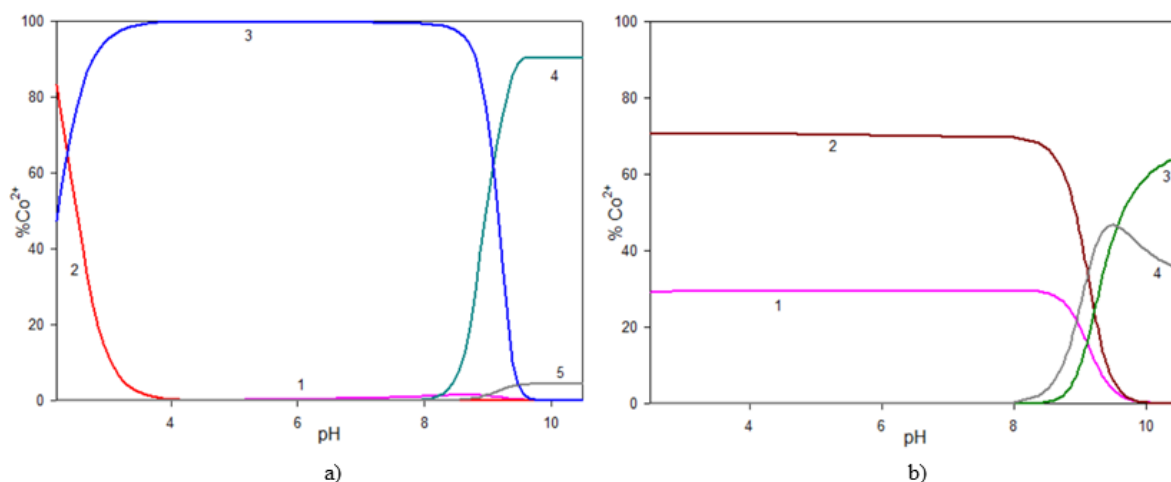
6.4.2. Układ Co(II)/UDP-Glc

Analiza danych potencjometrycznych dla układu Co(II)/UDP-Glc pozwoliła na zidentyfikowanie czterech form kompleksowych: Co(H₂UDP-Glc), Co(HUDP-Glc), Co(UDP-Glc)(OH)₂ oraz Co₂(UDP-Glc)₂H. W układzie Co(II)/UDP-Glc zaobserwowano występowanie formy dimerycznej w przeciwieństwie do układów zawierających jony miedzi(II) i niklu(II). Zebrane dane potencjometryczne zestawiono w Tabeli 29.

Tabela 29. Ogólne stałe trwałości ($\log\beta$) oraz stałe równowag tworzenia ($\log K_e$) dla układu Co(II)/UDP-Glc (odchylenia standardowe podano w nawiasach).

Forma kompleksu	$\log\beta$	$\log K_e$	Reakcja
Co(H ₂ UDP-Glc)	14,93(3)	1,66	Co(HUDP-Glc) + H ⁺ $\rightleftharpoons$ Co(H ₂ UDP-Glc)
Co(HUDP-Glc)	13,27(8)	3,58	Co ²⁺ + HUDP-Glc $\rightleftharpoons$ Co(HUDP-Glc)
Co ₂ (HUDP-Glc)(UDP-Glc)	26,51(1)	13,24	Co ²⁺ + Co(HUDP-Glc) + UDP-Glc $\rightleftharpoons$ Co ₂ (HUDP-Glc)(UDP-Glc)
Co(UDP-Glc)(OH) ₂	-12,84(8)	5,06	Co(OH) ₂ + UDP-Glc $\rightleftharpoons$ Co(UDP-Glc)(OH) ₂

Proces kompleksowania, w obu analizowanych układach, rozpoczyna się poniżej pH 2,5 (Rys. 40). W układzie równomolowym pierwszym tworzącym się kompleksem jest Co(H₂UDP-Glc), który przy pH 2,5, koordynuje około 85% jonów kobaltu(II) obecnych w roztworze (Rys. 40a). W tym samym układzie zaobserwowano obecność formy dimerycznej, Co₂(HUDP-Glc)(UDP-Glc), która dominuje w układzie w zakresie pH 3,0-9,0. W przedziale pH 4,0-8,0 kompleks ten wiąże 100% jonów Co(II). W układzie z nadmiarem liganda (1:2) od pH 2,5 do 9,0 dominuje forma Co(HUDP-Glc) (Rys. 40b). Związek ten w swoim maksimum koordynuje blisko 75% jonów Co(II). W wyższych wartościach pH w obu układach dominuje hydroksokompleks, Co(UDP-Glc)(OH)₂. Przy końcowej wartości analizowanego zakresu pH (10,5) w układzie równomolowym 90% jonów metalu uczestniczy w koordynacji, a przy dwukrotnym nadmiarze liganda jest to 65%. Na uwagę zasługuje fakt, że w układzie 1:2 formą konkurującą dla hydroksokompleksu jest wodorotlenek kobaltu(II), który stanowi 45% form obecnych w roztworze przy pH około 9,5.



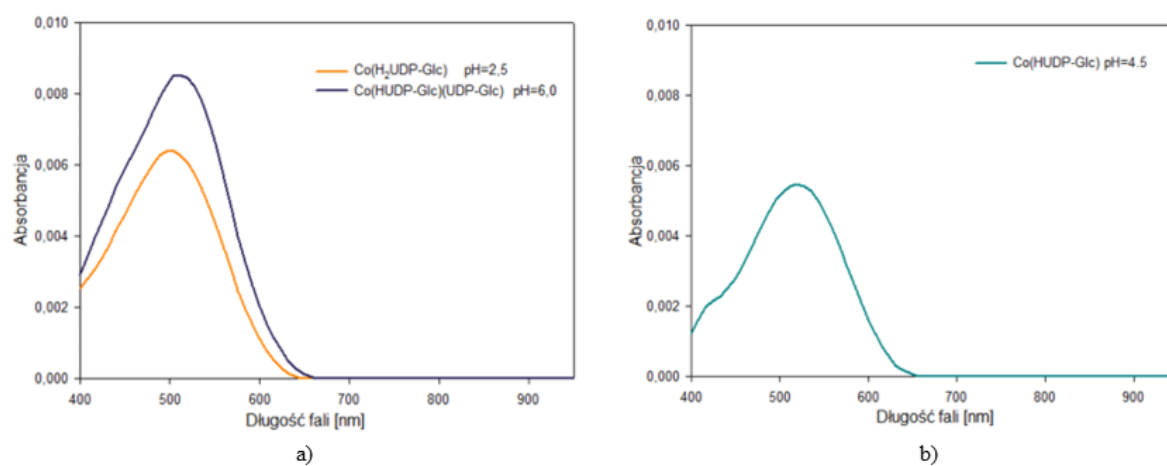
Rys. 40. Krzywe dystrybucji form dla układów: a) Co(II)/UDP-Glc 1:1 (1- Co^{2+} , 2- $\text{Co}(\text{H}_2\text{UDP-Glc})$, 3- $\text{Co}(\text{HUDP-Glc})(\text{UDP-Glc})$, 4- $\text{Co}(\text{UDP-Glc})(\text{OH})_2$, 5- $\text{Co}(\text{OH})_2$, b) Co(II)/UDP-Glc 1:2 (1- Co^{2+} , 2- $\text{Co}(\text{HUDP-Glc})$, 3- $\text{Co}(\text{UDP-Glc})(\text{OH})_2$, 4- $\text{Co}(\text{OH})_2$).

Powstawanie związków kompleksowych w układach zawierających jony kobaltu(II) zostało potwierdzone za pomocą spektroskopii UV-Vis.. Pomiary wykonano dla próbek przy wartościach pH, które maksymalizowały procentowy udział dominującej formy kompleksu. Uzyskane dane spektralne zestawiono w Tabeli 30.

Tabela 30. Parametry spektralne UV-Vis dla układu jony kobaltu(II)/UDP-Glc.

	Forma kompleksu	pH	λ_{max} [nm]	ϵ [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$]
1:1	$\text{Co}(\text{H}_2\text{UDP-Glc})$	2,5	502	12
	$\text{Co}_2(\text{HUDP-Glc})(\text{UDP-Glc})$	6,0	515	16
	$\text{Co}(\text{UDP-Glc})(\text{OH})_2$	10,5	-	-
1:2	$\text{Co}(\text{HUDP-Glc})$	4,5	510	10
	$\text{Co}(\text{UDP-Glc})(\text{OH})_2$	10,5	-	-

W widmach UV-Vis rejestrowanych dla układów z jonami kobaltu(II) (Rys. 41) zaobserwowano nieznaczne przesunięcie maksimum długości fali w kierunku dłuższych fal (efekt batochromowy) dla kompleksu $\text{Co}_2(\text{HUDP-Glc})(\text{UDP-Glc})$ w porównaniu z kompleksem $\text{Co}(\text{H}_2\text{UDP-Glc})$. Zmiana ta sugeruje zmiany w wewnętrznej sferze koordynacyjnej, która może wynikać z udziału większej liczby atomów donorowych lub z innej geometrii kompleksu w warunkach zwiększonej zasadowości. Nie było możliwe zarejestrowanie widm dla kompleksu $\text{Co}(\text{UDP-Glc})(\text{OH})_2$, niezależnie od stosunku molowego, ze względu na powstawanie osadu w przygotowanych próbkach. Osad ten świadczy o ograniczonej rozpuszczalności kompleksu w zasadowym zakresie pH i może wskazywać na wytrącanie się trudno rozpuszczalnych form hydroksylowych.



Rys. 41. Widmo spektroskopowe UV-Vis dla układu Co(II)/UDP-Glc: a) w stosunku molowym 1:1, b) w stosunku molowym 1:2.

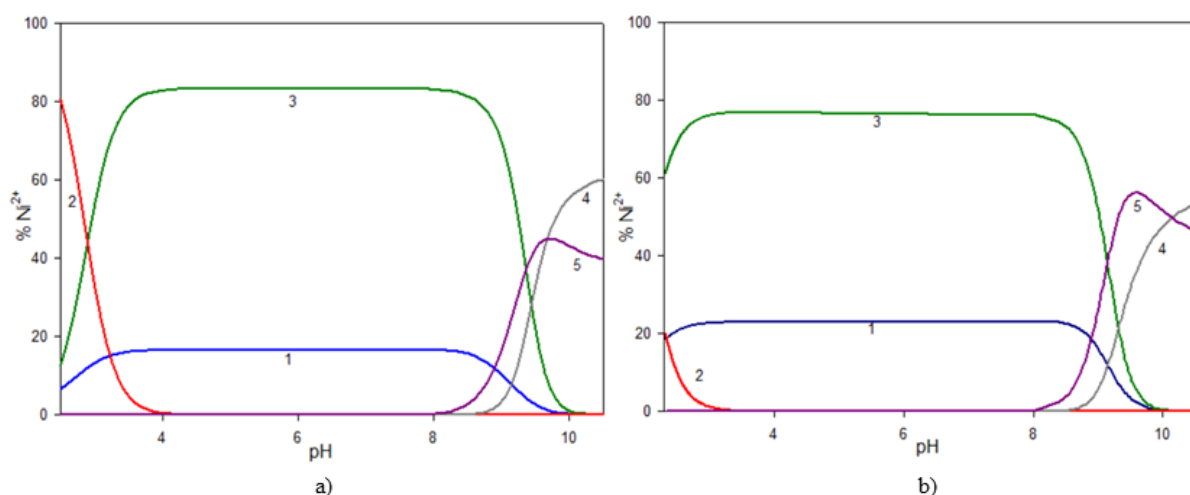
6.4.3. Układ Ni(II)/UDP-Glc

Wyniki badań potencjometrycznych wykazały obecność w analizowanych układach trzech form kompleksowych: $\text{Ni}(\text{H}_3\text{UDP-Glc})$, $\text{Ni}(\text{HUdp-Glc})$ oraz $\text{Ni}(\text{UDP-Glc})(\text{OH})_2$. Przeprowadzona charakterystyka termodynamiczna zidentyfikowanych form kompleksowych umożliwiła wyznaczenie ogólnych stałych trwałości ($\log\beta$) oraz stałych równowag reakcji tworzenia ($\log K_e$) (Tabela 31)

Tabela 31. Ogólne stałe trwałości ($\log\beta$) oraz stałe równowag reakcji tworzenia ($\log K_e$) dla układu Ni(II)/UDP-Glc (odchylenia standardowe podano w nawiasach).

Forma kompleksu	$\log\beta$	$\log K_e$	Reakcja
$\text{Ni}(\text{H}_3\text{UDP-Glc})$	18,93(5)	4,98	$\text{Ni}(\text{HUdp-Glc}) + 2 \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Ni}(\text{H}_3\text{UDP-Glc})$
$\text{Ni}(\text{HUdp-Glc})$	13,95(5)	4,26	$\text{Ni}^{2+} + \text{HUdp-Glc} \rightleftharpoons \text{Ni}(\text{HUdp-Glc})$
$\text{Ni}(\text{UDP-Glc})(\text{OH})_2$	-14,18(5)	3,61	$\text{Ni}(\text{OH})_2 + \text{UDP-Glc} \rightleftharpoons \text{Ni}(\text{UDP-Glc})(\text{OH})_2$

Proces kompleksowania w układzie równomolowym oraz z dwukrotnym nadmiarem liganda rozpoczyna się poniżej analizowanego zakresu pH (Rys. 42). Pierwszym tworzącym się kompleksem jest związek $\text{Ni}(\text{H}_3\text{UDP-Glc})$, który przy pH 2,5 koordynuje odpowiednio 80% (układ 1:1) i 20% (układ 1:2) jonów niklu(II). Od pH około 3,0 w systemie 1:1 dominuje kompleks $\text{Ni}(\text{HUdp-Glc})$, osiągając swoje maksimum w przedziale pH 4,0-8,5 i wiąże ponad 80% jonów Ni(II). W układzie 1:2 kompleks ten występuje w zakresie pH 2,5-9,0 i w swoim maksimum kompleksuje około 75% jonów Ni(II). W wyższych wartościach pH w obu układach obserwuje się obecność hydroksokompleksu, $\text{Ni}(\text{UDP-Glc})(\text{OH})_2$. Przy pH 10,5 forma ta wiąże około 60% w układzie równomolowym i 55% w układzie 1:2 jonów niklu(II). Dodatkowo, w układzie z dwukrotnym nadmiarem liganda, przy pH około 9,5 w układzie dominuje wodorotlenek niklu(II), $\text{Ni}(\text{OH})_2$.



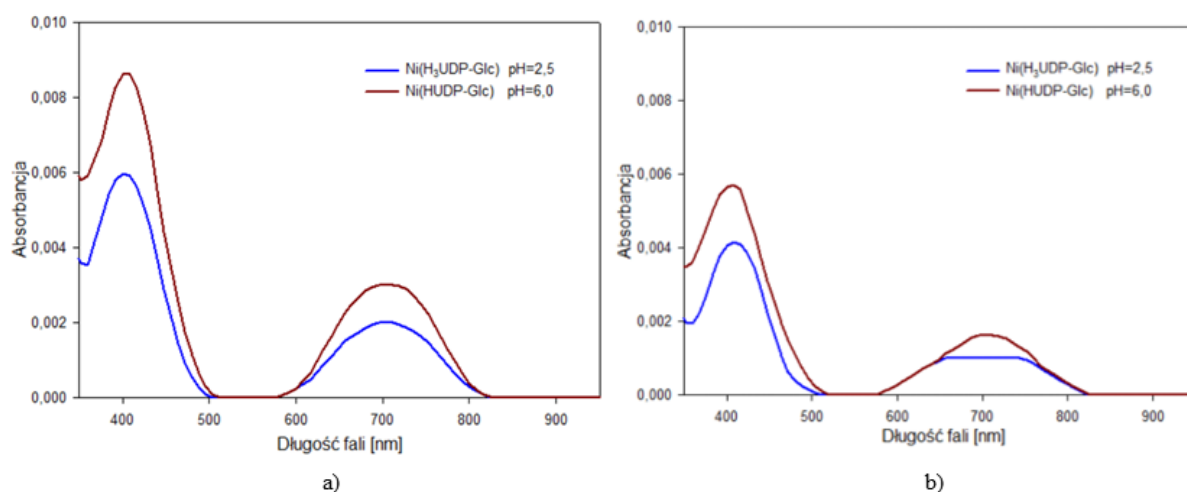
Rys. 42. Krzywe dystrybucji form dla układów: a) Ni(II)/UDP-Glc 1:1 (1-Ni²⁺, 2-Ni(H₃UDP-Glc), 3-Ni(HUDP-Glc), 4-Ni(UDP-Glc)(OH)₂, 5-Ni(OH)₂), b) Ni(II)/UDP-Glc 1:2 (1-Ni²⁺, 2-Ni(H₃UDP-Glc), 3-Ni(HUDP-Glc), 4-Ni(UDP-Glc)(OH)₂, 5-Ni(OH)₂).

Powstawanie związków kompleksowych w układach zawierających jony niklu(II) zostało potwierdzone przy użyciu metod spektroskopowych. Pomiary UV-Vis przeprowadzono dla próbek przy wartościach pH, w którym występuje maksymalny udział procentowy dominujących form kompleksowych. Uzyskane dane spektralne zestawiono w Tabeli 33.

Tabela 33. Parametry spektralne UV-Vis dla układu jony niklu(II)/UDP-Glc.

	Forma kompleksu	pH	λ_{max} [nm]	ϵ [M⁻¹cm⁻¹]
1:1	Ni(H ₃ UDP-Glc)	2,5	405	12
	Ni(HUDP-Glc)	6,0	398	18
	Ni(UDP-Glc)(OH) ₂	10,5	-	-
1:2	Ni(H ₃ UDP-Glc)	2,5	410	8
	Ni(HUDP-Glc)	6,0	400	12
	Ni(UDP-Glc)(OH) ₂	10,5	-	-

W widmach UV-Vis układów z jonami Ni(II) zaobserwowano niewielkie przesunięcia hipsochromowe, szczególnie w zakresie długości fal 600–800 nm (Rys. 54). Zmiany te są charakterystyczne dla modyfikacji wewnętrznej sfery koordynacyjnej kompleksów w odpowiedzi na wzrost zasadowości środowiska [139].



Rys. 54. Widmo spektroskopowe UV-Vis dla układu Ni(II)/UDP-Glc: a) w stosunku molowym 1:1, b) w stosunku molowym 1:2.

Przy niskich wartościach pH wewnętrzna sfera koordynacyjna badanych związków kompleksowych obejmuje atomy tlenu grup fosforanowych ($-O-PO_3H$) liganda, oraz w przypadku układu z UDP-GluA atom tlenu grupy $-(COOH)$. Wraz ze wzrostem pH, do sfery koordynacyjnej kompleksu włączony jest również atom azotu grupy $-(N(3)H)$ pierścienia urydyny. Różnice parametrów spektralnych, które otrzymane zostały dla analogicznych form kompleksowych mogą wynikać z różnych proporcji udziału jonów metalu w strukturze kompleksu, co wpływa na konfigurację i typ oddziaływań w wewnętrznej sferze koordynacyjnej.

6.4.4. Porównanie wyników badań dla układów jon metalu(II)/UDP-Glc

W ramach przeprowadzonych badań wykonano pomiary potencjometryczne, spektroskopię UV-Vis oraz spektroskopię EPR dla układów zawierających jony miedzi(II), kobaltu(II) oraz niklu(II) w obecności uridyno-5'-difosfoglukozy (UDP-Glc).

Analiza danych potencjometrycznych pozwoliła na identyfikację typów form kompleksowych, które występują w badanych układach oraz wyznaczenie ich ogólnych stałych trwałości ($\log\beta$) oraz stałych równowag reakcji tworzenia ($\log K_e$). We wszystkich analizowanych układach zaobserwowano występowanie protonowanych form kompleksowych typu $M(H_x\text{UDP-Glc})$, oraz hydroksokompleksów typu $M(\text{UDP-Glc})(\text{OH})_x$. Dodatkowo w układzie jony miedzi(II)/UDP-Glc zaobserwowano występowanie formy prostej $\text{Cu}(\text{UDP-Glc})$, a w układzie jony kobaltu(II)/UDP-Glc formy dimerycznej $\text{Co}_2(\text{HUDP-Glc})(\text{UDP-Glc})$. Formy typu $M(\text{HUDP-Glc})$ oraz $M(\text{UDP-Glc})(\text{OH})_2$ wyznaczono dla wszystkich badanych metali. Spośród analizowanych kompleksów, największą trwałością termodynamiczną cechowały się: $\text{Ni}(\text{HUDP-Glc})$ oraz $\text{Cu}(\text{UDP-Glc})(\text{OH})_2$. Kompleksy typu $M(\text{H}_3\text{UDP-Glc})$ stwierdzono jedynie w układach zawierających Cu^{2+} oraz Ni^{2+} , przy czym większą ogólną stałą trwałości wykazywał kompleks $\text{Cu}(\text{H}_3\text{UDP-Glc})$.

Pomiary spektroskopowe UV-Vis oraz EPR umożliwiły określenie zmian w wewnętrznej sferze koordynacyjnej kompleksów w zależności od pH roztworu. Przy niskich wartościach pH wewnętrzna sfera koordynacyjna badanych związków kompleksowych zawiera atomy tlenu grup fosforanowych ($-\text{O}-\text{PO}_3\text{H}$) liganda. Wraz ze wzrostem pH, atom azotu grupy $-\text{N}(3)\text{H}$ z pierścienia urydyny jest włączany do wewnętrznej sfery koordynacyjnej.

7. Podsumowanie

W dysertacji *Reakcje Kompleksowania Cukrowych Pochodnych Urydyno-5'-difosforanu – Charakterystyka Spektralna Oraz Badania Aktywności* analizie poddano układy:

- Cu(II)/UDP-GluA (1:1)
- Cu(II)/UDP-Glc (1:1; 1:2)
- Co(II)/UDP-Glc (1:1; 1:2)
- Ni(II)/UDP-Glc (1:1; 1:2)
- Cu(II)/UDP-GlcNAc (1:1; 1:2)
- Co(II)/UDP-GlcNAc (1:1; 1:2)
- Ni(II)/UDP-GlcNAc (1:1; 1:2)

W badaniach zastosowano szereg technik analitycznych: miareczkowanie potencjometryczne, spektroskopię UV-Vis, EPR, NMR oraz dichroizm kołowy (CD), a także test MTT do oceny aktywności biologicznej.

Przeprowadzono badania protonacji ligandów: kwasu urydyno-5'-difosfoglukuronowego (UDP-GluA), urydyno-5'-difosfo-N-acetyloglukozaminy (UDP-GlcNAc) oraz urydyno-5'-difosfoglukozy (UDP-Glc). Na podstawie otrzymanych danych wyznaczono stałe protonacji ligandów oraz sporządzono ich wykresy dystrybucji. Dla ligandów UDP-GluA i UDP-GlcNAc zidentyfikowano trzy formy, natomiast dla UDP-Glc – jedną formę.

Badania potencjometryczne przeprowadzone dla układu Cu(II)/UDP-GluA wykazały występowanie czterech form kompleksowych: dwóch form protonowanych: Cu(H₂UDP-GluA), Cu(HUDP-GluA) oraz dwóch hydroksokompleksów: Cu(UDP-GluA)(OH) oraz Cu(UDP-GluA)(OH)₃. Przeprowadzone badania spektroskopowe UV-Vis oraz EPR pozwoliły na wyznaczenie składu wewnętrznej sfery koordynacyjnej, do której należą atomy tlenu z reszt fosforanowych (-O-PO₃H), grupy karboksylowej (-COOH) oraz atom azotu (-N(3)H) z pierścienia urydyny. Badania EPR potwierdziły obecność w układzie wyłącznie form monomerycznych. Przeprowadzone badania NMR oraz CD potwierdziły obecność określonych chromoforów, a także wykazały występowanie tautomerii laktam-laktim w pierścieniu urydyny w warunkach zasadowych. Zjawisko to tłumaczy występowanie przesunięcia chemicznego tylko przy atomie węgla C4.

W układach Cu(II)/UDP-GlcNAc, Cu(II)/UDP-Glc, Ni(II)/UDP-GlcNAc oraz Ni(II)/UDP-Glc zaobserwowano występowanie tych samych typów form kompleksowych co w układzie Cu(II)/UDP-GluA: M(H_xL) oraz M(L)(OH)_x. Dodatkowo w układzie Cu(II)/UDP-Glc stwierdzono obecność formy prostej Cu(UDP-Glc). Natomiast w układach

Co(II)/UDP-GlcNAc oraz Co(II)/UDP-Glc oprócz występowania formy protonowanej typu $\text{Co}(\text{H}_x\text{UDP-Glc})$ oraz hydroksokompleksów $\text{Co}(\text{L})(\text{OH})_2$ wykazano występowanie form dimerycznych oraz podwójnych typu $\text{Co}_2(\text{HUDP-GlcNAc})_2$, $\text{Co}(\text{HUDP-GlcNAc})_2$, $\text{Co}(\text{UDP-GlcNAc})_2$ oraz $\text{Co}_2(\text{HL})(\text{L})$.

Formy $\text{M}(\text{HUDP-Glc})$ oraz $\text{M}(\text{UDP-Glc})(\text{OH})_2$ zostały zidentyfikowane we wszystkich analizowanych układach. Na podstawie ogólnych stałych trwałości ($\log\beta$) wykazano, że najbardziej trwałe termodynamicznie są formy $\text{Ni}(\text{HUDP-Glc})$ oraz $\text{Cu}(\text{UDP-Glc})(\text{OH})_2$. Formy $\text{M}(\text{H}_3\text{UDP-Glc})$ oraz $\text{M}(\text{HUDP-GlcNAc})$ wyznaczono dla układów zawierających jony miedzi(II) oraz jony niklu(II), a najbardziej trwałe termodynamicznie są formy $\text{Cu}(\text{H}_3\text{UDP-Glc})$ oraz $\text{Ni}(\text{HUDP-GlcNAc})$. W układach zawierających jony kobaltu(II) oraz miedzi(II) zaobserwowano występowanie formy $\text{M}(\text{UDP-GlcNAc})(\text{OH})_2$, z czego forma zawierająca jony Cu^{2+} wykazuje większą trwałość.

W układach $\text{Cu}(\text{II})/\text{UDP-GluA}$, $\text{Cu}(\text{II})/\text{UDP-Glc}$ oraz $\text{Cu}(\text{II})/\text{UDP-GlcNAc}$ wykazano występowanie tych samych form kompleksowych: $\text{Cu}(\text{H}_2\text{L})$, $\text{Cu}(\text{HL})$ oraz $\text{Cu}(\text{L})(\text{OH})_3$. Najbardziej trwałe termodynamicznie okazały się formy: $\text{Cu}(\text{H}_2\text{UDP-GlcNAc})$, $\text{Cu}(\text{HUDP-GlcNAc})$ oraz $\text{Cu}(\text{UDP-Glc})(\text{OH})_3$.

Badania spektroskopowe wykazały, że skład wewnętrznej sfery koordynacyjnej zidentyfikowanych związków kompleksowych, analogicznie jak w układzie $\text{Cu}(\text{UDP-GluA})$ zależy do pH roztworu. Przy niskich wartościach pH w koordynację zaangażowane są atomy tlenu reszt fosforanowych ($-\text{O}-\text{PO}_3\text{H}$), a w przypadku układu zawierającym kwas urydyno-5'-difosfoglukuronowy dodatkowo atom tlenu z grupy karboksylowej ($-\text{COOH}$). W warunkach zasadowych dochodzi do deprotonacji azotu z grupy ($-\text{N}(3)\text{H}$) w pierścieniu urydyny i jego włączenia do sfery koordynacyjnej atomu centralnego. Badania EPR dla układów zawierających jony miedzi(II) potwierdziły występowanie protonowanych form kompleksowych w analizowanych próbkach.

Wstępne badania biologiczne wykazały zwiększoną aktywność biologiczną kompleksów $\text{Cu}(\text{HUDP-Glc})$ oraz $\text{Cu}(\text{UDP-GluA})$ względem wolnego liganda UDP-GluA wobec linii A549 (komórki raka płuc) po 72h inkubacji. Dla kompleksu $\text{Cu}(\text{HUDP-GlcNAc})$ i wolnego liganda UDP-GlcNAc aktywność metaboliczna komórek T2H (rak pęcherza moczowego) po 24h inkubacji była porównywalna. Wyniki wskazują, że cytotoksyczność analizowanych związków kompleksowych jest silnie zależna od czasu inkubacji. Dodatkowo, dla linii SV HUC-1 (zdrowe komórki nabłonka urotelialnego) nie zaobserwowano istotnych zmian aktywności metabolicznej po 24 h inkubacji, zarówno dla ligandów, jak i ich kompleksów.

8. Bibliografia

- [1] Mirza, A., Z., *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, **2019**, 38, 836-857, doi:10.1080/15257770.2019.1615623
- [2] Jordheim, L., P., Durantel, D., Zoulim, F., Dumontet, C., *Nature Reviews Drug Discovery*, **2013**, 12, 447–464, doi: 10.1038/nrd4010
- [3] Zhang, Y., Gao, Y., Wen, X., Ma, H., *Asian Journal of Pharmaceutical Science*, **2014**, 9, 65–74, doi: 10.1016/j.ajps.2013.12.006
- [4] Shelton, J., Lu, X., Hollenbaugh, J., A., Cho, J., H., Amblard, F., Schinazi, R., F., *Chemical Reviews*, **2016**, 116, 14379–14455, doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00209
- [5] Ewald, B., Sampath, D., Plunkett, W., *Oncogene*, **2008**, 27, 6522–6537, doi: 10.1038/onc.2008.316.
- [6] Krol, E., Wandzik, I., Pastuch-Gawolek, G., Szewczyk, B., *Molecules*, **2018**, 23, 1547, 1-18, doi: 10.3390/molecules23071547
- [7] Krol, E., Wandzik, I., Gromadzka, B., Nidzworski, D., Rychlowska, M., Matlacz, M., Tyborowska, J., Szewczyk, B., *Antiviral Research*, **2013**, 100, 90-97, doi: 10.1016/j.antiviral.2013.05.001
- [8] Krol, E., Wandzik, I., Krejmer-Rabalska, M., Szewczyk, B., *International Journal of Molecular Sciences*, **2017**, 18, 1700, 1-14
- [9] Mikkola, S., *Molecules*, **2020**, 25, 5755; doi: 10.3390/molecules25235755
- [10] Qiao, M., Li, B., Ji, Y., Linhardt, R., Zhang, X., *Critical Reviews in Biotechnology*, **2020**, 2-12, doi: 10.1080/07388551.2020.1844623
- [11] Miyagawa, A., Tiyya, S., Ohmura, I., Myiazaki, S., Kamiya, T., Yamamura H., *The Journal of Organic Chemistry*, **2020**, 85, 23, 15645-15651, doi: 10.1021/acs.joc.0c01943
- [12] Merino, P., Delso, I., Tejero, T., Ghirardello, M., Juste-Navarro, V., *Asian Journal of Organic Chemistry*, **2016**, 5, 1413-1427, doi: 10.1002/ajoc.201600396
- [13] Ahmadipour, S., Miller, G., J., *Carbohydrate Research*, **2017**, 451, 95-109, doi: 10.1016/j.carres.2017.08.014
- [14] Wang S., Zhang, J., Wei, F., Li, W., Wen, L., *Journal of the American Chemical Society*, **2022**, 144, 9980-9989, doi: 10.1021/jacs.2c03138
- [15] Tanaka, H., Yoshimura, Y., Jørgensen, M. R., Cuesta-Seijo, J. A., & Hindsgaul, O., *Angewandte Chemie International Edition*, 2012, 51(46), 11531–11534, doi:10.1002/anie.201205433
- [16] Timmons, S., C., Jakeman, D., L., *Organic Letters*, **2007**, 9, 1227-1230, doi: 10.1021/ol063068d

- [17] Muthana, M. M., Qu, J., Li, Y., Zhang, L., Yu, H., Ding, L., Chen, X., *Chemical Communications*, 2012, 48, 2728, doi: 10.1039/c2cc17577k
- [18] Wen, L., Gadi, M., R., Zheng, Y., Gibbons, Ch., Kondengaden, S., M., Zhang, J., Wang, P., G., *ACS Catalysis*, **2018**, 8, 7659-7666, doi: 10.1021/acscatal.8b02081
- [19] Qin, X., Wang, X., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2018**, 158, 280-287, doi: 10.1016/j.jpba.2018.06.013
- [20] Rejzek, M., Hill, L., Hems, E., S., Kuhaudomlaep, S., Wagstaff, B., A., Field, R., A., *Methods in Enzymology*, **2017**, 597, 209-238, doi: 10.1016/bs.mie.2017.06.005
- [21] Silsirivanit, A., *Advances in Clinical Chemistry*, **2019**, 89, 198-213, doi: 10.1016/bs.acc.2018.12.005
- [22] Taniguchi, N., Kizuka, Y., *Advances in Cancer Reseach*, **2015**, 126, 11-51, doi: 10.1016/bs.acr.2014.11.001
- [23] Peracaula, R., Barrabés, S., Sarrats, A., Rudd, P. M., de Llorens, R., *Disease Markers*, **2008**, 25, 207–218, doi:10.1155/2008/797629
- [24] Silva, M., L., S., *Biochemica et Biophysica Acta – Reviews on Cancer*, **2015**, 1856, 165-177, doi: 10.1016/j.bbcan.2015.07.002
- [25] Oldrini, D.; del Bino, L.; Arda, A.; Carboni, F.; Henriques, P.; Angiolini, F.; Quintana, J.I.; Calloni, I.; Romano, M.R.; Berti, F.; Jimenez-Barbero, J., Margarit, I., Adamo, R., *Chemistry – A European Journal*, **2020**, 26, 7018–7025, doi.: 10.1002/chem.202000284
- [26] Mettu, R.; Chen, C.-Y.; Wu, C.-Y., *Journal of Biomedical Science*, **2020**, 27, 9, doi.: 10.1186/s12929-019-0591-0
- [27] Colombo, C.; Pitorillo, O.; Lay, L. *Molecules*, **2018**, 23, 1712, doi.: 10.3390/molecules23071712
- [28] Wei, M.-M., Wang, Y.-S.; Ye, X.-S. *Medicinal Research Reviews*, **2018**, 38, 1003–1026, doi.: 10.1002/med.21493
- [29] Kulasingam, V., Diamandis, E., P., *Nature Clinical Practice Onkology*, **2008**, 5, 588-599, doi.: 10.1038/ncponc1187
- [30] Ludwig, J., A., Weinstein, J., N., *Nature Reviews Cancer*, **2005**, 5, 845-856, doi: 10.1038/nrc1739
- [31] Perkins, G., L., Slater E., D., Sanders, G., K., Prichard, J., G., *American Family Physician*, **2003**, 68, 1075-1082
- [32] Kornfeld, R., Kornfeld, S., *Annual Review of Biochemistry*, **1985**, 54, 631-664, doi: 10.1146/annurev.bi.54.070185.003215

- [33] Darula, Z., Medzihradszky, K., F., *Molecular and Cellular Proteomics*, **2018**, 17, 2-17, doi.: 10.1074/mcp.MR117.000126
- [34] Ko, H., Das, A., Carter, R., L., Fricks, I., P., Zhou, Y., Ivanov, A., A., Melman A., Joshi, B., V., Kovac, P., Hajdich, J., Kirk, K., L., Harden, T., K., Jacobson, K., A., *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **2009**, 17, 5298-5311, doi.: 10.1016/j.bmc.2009.05.024
- [35] Besada, P., Shin, D., H., Costanzi, S., Ko, H., Mathe, Ch., Gagneron, J., Gosselin, G., Maddileti, S., Harden T., K., Jacobson, K., A., *Journal of Medicinal Chemistry*, **2006**, 49, 5532-5543, doi.: 10.1021/jm060485n
- [36] Ko, H., Fricks, I., Ivanov A., A., Harden, T., K., Jacobson, K., A., *Journal of Medicinal Chemistry*, **2007**, 50, 2023-2039, doi.: 10.1021/jm061222w
- [37] Stachowiak, K., Zabiszak, M., Grajewski, J., Teubert, A., Bajek, A., Jastrzab, R., *Molecules*, **2024**, 29,3695, doi.: 10.3390/molecules29153695
- [38] Jastrzab, R. Nowak, M., Skorbanska, M., Zabiszak, M., *Journal of Coordination Chemistry*, **2016**, 69, 2174-2181, doi.: 10.1080/00958972.2016.1205738
- [39] Oka, T., J., Y., *The FEBS Journal*, **2006**, 273, 2645-2657, doi.: 10.1111/j.1742-4658.2006.05281.x
- [40] Weyler, Ch., Bureik, M., Heinzl, E., *Biotechnology Letters*, **2016**, 38, 477-481, doi.: 10.1007/s10529-015-1995-x
- [41] Simons, E., S., Toone, E., J., Ostroff, G., Bednarski, M., D., Whitesides, G., M., *Methods in Enzymology*, **1989**, 179, 275-287, doi.: 10.1016/0076-6879(89)79129-1
- [42] Hauser, S., C., Ransil, B., J., Ziurys, J., C., Gollan, J., L., *Biochemica et Biophysica Acta*, **1988**, 967, 141-148, doi.: 10.1016/0304-4165(88)90003-7
- [43] Kobayashi, T., Seelman, J., E., Coughtrie, M., W., H., Burchell, B., *Biochemical Journal*, **2006**, 400, 281-289, doi.: 10.1042/BJ20060429
- [44] Vina, I., Semjonovs, P., Linde, R., Patetko, A., *IJRRAS*, **2013**, 14, 17-25, www.arpapress.com/Volumes/Vol14Issue1/IJRRAS_14_1_02.pdf
- [45] Muraoka, M., Kawakita, M., Ishida, N., *The FEBS Letters*, **2001**, 495, 87-93, doi.: 10.1016/S0014-5793(01)02358-4
- [46] Miners, J., O., McKinnon, R., A., Mackenzie, P., I., *Toxicology*, **2002**, 181-182, 453-456, doi.: 10.1016/s0300-483x(02)00449-3
- [47] Sanchez-Dominguez, C., N., Gallardo-Blanco, H., L., Salinas-Santander, M., A., Ortiz-Lopez, R., *Experimental and Therapeutic Medicine*, **2018**, 16, 3-11, doi.: 10.3892/etm.2018.6184

- [48] Weiwer, M., Sherwood, T., Green, D., E., Chen, M., DeAngeli, P., L., Liu, J., Linhardt, R., J., *Journal of Organic Chemistry*, **2008**, 73, 7631-7637, doi.: 10.1021/jo801409c
- [49] Gottschalk, J., Zaun, H., Eisele, A., Kuballa, J., Elling, L., *International Journal of Molecular Science*, **2019**, 20, 5664, doi.: 10.3390/ijms20225664
- [50] Gottschalk, J., Blaschke, L., Asmann, M., Kuballa, J., Elling, L., *ChemCatChem*, **2021**, 13, 1-11, doi.: 10.1002/cctc.202100462
- [51] Baytas, S., N., Linhardt, R., J., *Drug Discovery Today*, **2020**, 25, 2095-2109, doi.: 10.1016/j.drudis.2020.09.011
- [52] Borg, A., J., E., Dennig, A., Weber, H., Nidetzky, B., *The FEBS Journal*, **2021**, 288, 1163-1178, doi.: 10.1111/febs.15478
- [53] Kuang, B., Zhao, X., Zhou, Ch., Zeng, W., Ren, J., Ebert, B., Beahan, Ch., T., Deng, X., Zeng, Q., Zhou, G., Doblin, M., S., Heazlewood, J., L., Bacic, A., Chen, X., W., A.-M., *Molecular Plant*, **2016**, 9, 1119-1131, doi.: 10.1016/j.molp.2016.04.013
- [54] Ivanov Kavkova, E., Blöchl, C., Tenhaken, R., *Plant Biology*. **2018**, 21, 95-102, doi.:10.1111/plb.12898
- [55] Mahour, R., Klapproth, J., Rexer, T., F., T., Schildbach, A., Klamt, S., Pietzsch, M., Rapp, E., Reichl, U., *Journal of Biotechnology*, **2018**, 283, 120-129
- [56] Maruyama, D., Nishitani, Y., Nonaka, T., Kita, A., Fukami, T., A., Mio, T., Yamada-Okabe, H., Yamada-Okabe, T., Miki, K., *The Journal of Biological Chemistry*, **2007**, 282, 17221-17230
- [57] Wyllie, J., A., McKay, M., V., Barrow, A., S., Soares de Costa, T., P., *IUBMB Life*, **2022**, 74, 1232-1252
- [58] Zhou, J., Fan, L., Wei, P., Huang, L., Cai, J., Xu, Z., *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, **2010**, 40, 294-304, doi.: 10.1080/10826068.2010.488518
- [59] Okuyama, K., Hamamoto, T., Ishige, K., Takenouchi, K., Noguchi, T., *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **2000**, 64, 386-392, doi.: 10.1271/bbb.64.386
- [60] Rani, Ch., Khan, I., A., *European Journal of Pharmaceutical Science*, **2016**, 83, 62-70, doi.: 10.1016/j.ejps.2015.12.013
- [61] Zhang, W., Jones, V., C., Scherman, M., S., Mahapatra, S., Crick, D., Bhamidi, S., Xin, Y., McNeil, M., R., Ma, Y., *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **2008**, 40, 2560-2571, doi.: 10.1016/j.biocel.2008.05.003
- [62] Oikari, S., Kettunen, T., Tiainen, S., Hayrinen, J., Masarwah, A., Sudah, M., Sutela, A., Vanninen, R., Tammi, M., Auvinen, P., *Matrix Biology*, **2018**, 67, 63-74, doi.: 10.1016/j.matbio.2017.12.015

- [63] Li, Z., Zhang, J., Ai, H.-W., *ACS Central Science*, **2021**, 7, 1763-1770, doi.: 10.1021/acscentsci.1c00745
- [64] Love, D., C., Krause, M., W., Hanover, J., A., *Seminars in Cell and Development Biology*, **2010**, 21, 646-654, doi.: 10.1016/j.semcdb.2010.05.001
- [65] Yang, X., Qian, K., *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **2017**, 18, 452-465, doi.: 10.1038/nrm.2017.22
- [66] Ranjan, A., Kalraiya, R., D., *Journal of Bioscience*, **2013**, 38, 867-876, doi.: 10.1007/s12038-013-9382-z
- [67] Edvardson, S., Ashikov, A., Jalas, C., Sturiale, L., Shaag, A., Fedick, A., Elpeleg, O. *Journal of Medical Genetics*, **2013**, 50, 733–739. doi:10.1136/jmedgenet-2013-101753
- [68] Flores-Diaz, M., Alape-Giron, A., Persson, B., Pollesello, P., Moos, M., von Eichel-Streiber, Ch., Thelestam, M., Florin, I., *The Journal of Biological Chemistry*, **1997**, 272, 23784-23791, doi.: 10.1074/jbc.272.38.23784
- [68] Meng, M., Geisler, M., Johansson, H., Harholt, J., Scheller, H., V., Mellerowicz, E., J., Kleczkowski, L., A., *Plant and Cell Physiology*, **2009**, 50, 998-1011, doi.: 10.1093/pcp/pcp052
- [70] Wolfe, A., L., Zhou, Q., Toska, E., Galeas, J., Ku, A., A., Koche, R., P., Bandyopadhyay, S., Scaltriti, M., Lebrilla, C., B., McCormic, F., Kim, S., E., *PNAS*, **2021**, 118, 1-7, doi.: 10.1073/pnas.2103592118
- [71] Pirce, M., J., Nguyen, A., D., Byemerwa, J., K., Flowers, J., Baeta, C., D., Goodwin, C., R., *Oncotarget*, **2023**, 14, 843-857, doi.: 10.18632/oncotarget.28514
- [72] Ralevic, V., *Reference Module in Biomedical Sciences*, **2015**, 1-3, doi.: 10.1016/b978-0-12-801238-3.09699-9
- [73] Das, A., Ko, H., Burianek, L., E., Barrett, M., O., Kendall Harden, T., Jacobson, K., A., *Journal of Medicinal Chemistry*, **2010**, 53, 471-480, doi.: 10.1021/jm901432g
- [74] Zou, Y., Xue, M., Wang, W., Cai, L., Chen, L., Liu, J., Wang, P., G., Shen, J., Chen, M., *Carbohydrate Research*, **2013**, 373, 76-81, doi.: 10.1016/j.carres.2013.03.005
- [75] Moustakas, M., *Materials*, 2021, 14, 549, 2-4, doi:10.3390/ma14030549
- [76] Wang, Ch., Zhang, R., Wei, X., Lv, M., Jiang, Z., *Advances in Immunology*, 2020, 145, 187-241, doi:10.1016/bs.ai.2019.11.007
- [77] Gupta S., P., *Bioorganic & Organic Chemistry*, **2018**, 2, 5, 221-224, doi:10.15406/mojboc.2018.02.0008
- [78] Jurca, T., Marian, E., Vicaș, L. G., Mureșan, M. E., & Fritea, L., *Spectroscopic Analyses-Developments and Applications*, 2017, Chapter7, 123-142, doi:10.5772/65390

- [79] Zoroddu M., A., Aaseth, J., Crisponi, G., Medici, S., Peana, M., Nurchi, V., M., *Journal of Inorganic Biology*, **2019**, 195, 120-129, doi.: 10.1016/j.jinorgbio.2019.03.013
- [80] Mittapally, S., Tarannum, R., Parveen, S., *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, **2018**, 8, 411-419, doi.: 10.22270/jddt.v8i6-s.2063
- [81] Zhang, Y., Shareena Dasari, T., P., Deng, H., Yu, H., *Journal of Environmental Science And Health, Part C: Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews*, **2015**, 1-67, doi.: 10.1080/10590501.2015.1055161
- [82] Hu, H., Mo, Z., Hu, X., He, Q., Zhang, Z., Xu, Z., *Journal of Nanobiotechnology*, **2022**, 20, 457, 1-21, doi.: 10.1186/s12951-022-01661-w
- [83] Icsel, C., Yilmaz, V., T., Aydinlik, S., Aygun, M., *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2020**, 202, 112535, 1-10, doi.: 10.1016/j.ejmech.2020.112535
- [84] Barreiro, E., Casas, J., S., Couce, M., D., Sanchez, A., Seoane, R., Perez-Estevez, A., Sordo, J., *Gold Bull. Springer*, **2012**, 45, 23-34, doi.: 10.1007/s13404-011-0040-7
- [85] Desoize, B., *Anticancer Research*, **2004**, 24, 1529-1544
- [86] Rezayatmand, H., Razmkhah, M., Razeghian-Jahromi, I., *Steam Cell Research & Therapy*, **2022**, 13, 181, doi.: 10.1186/s13287-022-02856-6
- [87] Ingle, A., P., Sudhir Shende, P., P., Gupta, I., Biswas, J., K., da Silva Martins, L., H., Rai, M., *Springer International Publishing AG, Biomedical Applications of Metals*, 2018, 4, 95-112
- [88] Hordyjewska, A., Popiołek, Ł., Kocot, J., *Biometals*, **2014**, 27, 611-621, doi.: 10.1007/s10534-014-9736-5
- [89] Osredkar, J., Sustar, N., *Clinical Toxicology*, **2011**, 3, 1-19, doi.: /10.4172/2161-0495.S3-001
- [90] Kirsipuu, T., Zadoroznaja, A., Smirova, J., Friedemann, M., Plitz, T., Tõugu, V., Palumaa, P., *Scientific Reports*, **2010**, 10, 5686, doi.: 10.1038/s41598-020-62560-4
- [91] Lopez, B., Gonazalez, A., Hermida, N., Valencia, F., de Teresa, E., Diez, J., *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **2010**, 299, H1-H9, doi.: 10.1152/ajpheart.00335.2010
- [92] Johnston, K., A., Lopez, K., M., *Cancer Letters*, **2018**, 417, 147-181, doi.: 10.1016/j.canlet.2018.01.006
- [93] Wang, T-H., Hsia, S-M., Shieh, T-M., *International Journal of Molecular Science*, **2017**, 18, 62, doi.: 10.3390/ijms18010062
- [94] Moon, H-J., Finney, J., Ronnebaum, T., Mure, M., *Bioorganic Chemistry*, **2014**, 57, 231-241, doi.: 10.1016/j.bioorg.2014.07.003

- [95] Zhang, X., Liu, M., *RCSB PDB*, **2018**, doi.: 10.2210/pdb5ZE3/pdb
- [96] Younus, H., *International Journal of Health Science*, **2018**, 12, 88-93
- [97] Perry, J., J., P., Shin, D., S., GetzoffE., D., Tainer, J., A., *Biochemica et Biomedica Acta*, **2010**, 1804, 245-262, doi.: 10.1016/j.bbapap.2009.11.004
- [98] Yasui, K., Baba, A., *Inflammation Research*, **2006**, 55, 359-363, doi.: 10.1007/s00011-006-5195-y
- [99] Noor, R., Mittal, S., Iqbal, J., *Medical Science Monitor*, **2002**, 8, RA210–5, PMID: 12218958
- [100] Greenlund, L., J., Deckwerth, T., L., Johnson Jr., E., M., *Neuron*, **1995**, 14, 303-315, doi.: 10.1016/0896-6273(95)90287-2 [101]
- [101] Troy C., M., Shelanski, M., L., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1994**, 91, 6384-6387, doi.: 10.1073/pnas.91.14.6384
- [102] Luisa Corvo, M., Jorge, J., C., van't Hof, R., Cruz, M., E., Crommelin, D., J., Storm, G., *Biochemica et Biomedica Acta*, **2002**, 1564, 227-236, doi.: 10.1016/s0005-2736(02)00457-1
- [103] Ito, S., Ishii, T., Uchida, K., *RCSB PDB*, **2008**, doi.: 10.2210/pdb2Z7U/pdb
- [104] Brischigliaro, M., Zeviani, M., *BBA – Bioenergetics*, **2021**, 1862, 148335, doi.: 10.1016/j.bbabbio.2020.148335
- [105] Yoshikawa, S., Shimada, A., *Chemical Reviews*, **2015**, 115, 1936-1989, doi.: 10.1021/cr500266a
- [106] Wikström, M., Sharma, V., *BBA - Bioenergetics*, **2018**, 1859, 692-698, doi.: 10.1016/j.bbabbio.2018.03.009
- [107] Gorman, G., S., Chinnery, P., F., DiMauro, S., Hirano, M., Koga, Y., McFarland, R., Suomalainen, A., Thorburn, D., R., Zeviani, M., Turnbull, D., M., *Nature Reviews Disease Primers*, **2016**, 2, 16080, doi.: 10.1038/nrdp.2016.80
- [108] Gustafsson, C., M., Falkenberg, M., Larsson, N., G., *Annual Review of Biochemistry*, **2016**, 85, 133–160, doi.: 10.1146/annurev-biochem-060815-014402
- [109] Jastrzab, R., *New Journal Of Chemistry*, **2010**, 34, 2864-2874
- [110] Czarnek, K., Terpiłowska, S., Siwicki, A., K., *Central European Journal of Immunology*, **2015**, 40(2), 236-242, 2015, doi.: 10.5114/ceji.2015.52837
- [111] Battaglia, V., Compagnone, A., Bandino, A., Bragadin, M., Rossi, C. A., Zanetti, F., Toninello, A., *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **2009**, 41(3), 586–594, doi.: 10.1016/j.biocel.2008.07.012

- [112] Yamada, K., *Metal Ions in Life Science. Interrelation between Essential Metal Ions and Human Disease. Cobalt: Its Role in Health and Disease*, **2013**, 13, 9, 295-320, doi.: 10.1007/978-94-007-7500-8_9
- [113] Khrustalev, V., V., Khrustaleva, T., A., Poboinev, V., V., Karchevskaya, K., I., Shablovskaya, E., A., Terekhova, T., G., *Metallomics*, **2019**, 10, 1-31, doi.: 10.1039/C9MT00205G
- [114] Herrmann, W., Obeid, R., *Subcell Biochemistry*, **2012**, 56, 301-322, doi.: 10.1007/978-94-007-2199-9_16
- [115] Briani, Ch., Dalla Torre, Ch., Citton, V., Manara, R., Pompanin, S., Binotto, G., Adami, F., *Nutrients*, **2013**, 5, 4521-4539, doi.: 10.3390/nu5114521
- [116] Moore, E., Bellomo, R., *Annals of Intensive Care*, **2011**, 1, 3, doi.: 10.1186/2110-5820-1-3
- [117] Kimakova, P., Solar, P., Solarova, Z., Komel, R., Debeljak, N., *International Journal of Molecular Science*, **2017**, 18, 1519, doi.: 10.3390/ijms18071519
- [118] Peng, B., Kong, G., Yang, Ch., Ming, Y., *Cell Deth and Disease*, **2020**, 11, 79, doi.: 10.1038/s41419-020-2276-8
- [119] Cheetham, J., C., Smith, D., M., Aoki, K., H., Stevenson, J., L., Hoeffel, T., J., Syed, R., S., Egrie, J., Harvey, T., S., *RCSB PDB*, **1999**, doi.: 10.2210/pdb1BUY/pdb
- [120] Genchi, G., Carocci, A., Lauria, G., Sinicropi, M. S., & Catalano, A., *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **2020**, 17(3), 679, doi.:10.3390/ijerph17030679
- [121] Maroney, M., J., Ciurli, S., *Chemical Reviews*, **2014**, 114, 4206-4228, doi.: 10.1021/cr4004488
- [122] Boer, J., L., Mulrooney, S., B., Hausinger, R., P., *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2014**, 544, 142-152, doi.: 10.1016/j.abb.2013.09.002
- [123] Ragsdale, S., W., *The Journal of Biological Chemistry*, **2009**, 284, 18571-18575, doi.: 10.1074/jbc.R900020200
- [124] Volbeda, A., Martin, L., Cavazza, C., Matho, M., Faber, B., W., Roseboom, W., Albracht, S., P., Garcin, E., Rousset, M., Fontecilla-Camps, J., C., *RCSB PDB*, **2005**, doi.: 10.2210/pdb1YQ9/pdb
- [125] Tabrizi, L., McArdle, P., Erxleben, A., Chiniforoshan, H., *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2015, 103, 516–529. doi:10.1016/j.ejmech.2015.09.018
- [126] Ma, Ch., Li, F., He, Z., Zhao, S., Yang, Y., Gu, Z., *Frontiers in Pharmacology*, **2023**, 14, 1-24, doi.: 10.3389/fphar.2023.1113808

- [127] Szczepaniak, W., *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, Wydawnictwo Naukowe PWN, **2008**, 415 s., ISBN 978-83-01-14210-0
- [128] Cygański, A., *Metody spektroskopowe w chemii analitycznej*, Wydawnictwo Naukowe PWN, **2017**, 506 s., ISBN 978-83-01-19357-7
- [129] Vogel, A., I., *Preparatyka organiczna*, Wydawnictwo Naukowe PWN, **2018**, 1524 s., ISBN 978-83-01-19953-1
- [130] Dinitto, J., M., Kenney, J., M., *Applied Spectroscopy*, **2012**, 66, 180-187, doi.: 10.1366/11-06417
- [131] Micsonai, A., Wien, F., Kernya, L., Lee, Y-H., Goto, Y., Refregiers, M., Kardos, J., *PANS*, **2015**, E3095-E3103, doi.: 10.1073/pnas.1500851112
- [132] Miles, A., J., Wallace, B., A., *Chemical Society Reviews*, **2015**, 45, 4859-4872, doi.: 10.1039/c5cs00084j
- [133] Rogers, D., M., Jasim, S., B., Dyer, N., T., Auvray, F., Refregiers, M., Hirst, J., D., *Cell Press Reviews*, **2019**, Chem 5, 2751–2774, doi.: 10.1016/j.chempr.2019.07.008
- [134] Hoffmann, S., V., Fano, M., van de Weert, M., *Circular Dichroism Spectroscopy for Structural Characterization of Proteins. In Müllertz A, Perrie Y, Rades T, editors, Analytical Techniques in the Pharmaceutical Sciences. New York: Springer*, **2016**, rozdział 6, 223-251 doi: 10.1007/978-1-4939-4029-5
- [135] Twaruzek, M., Zastempowska, E., Soszczynska, E., Altyn, I., *Folia Biologica et Oecologica*, 2018, 14, 23-32, doi.: 10.1515/fobio-2017-0006
- [136] Krzyszton-Russjan, J., Ksiazek, I., Anuszevska, E., *Farmacja Polska*, **2009**, 65, 395-402
- [137] Bahuguna, A., Khan, I., Bajpai, V., K., Kang, S., Ch., *Bangladesh Journal of Pharmacology*, **2017**, 12, 115-118, doi.: 10.3329/bjp.v12i2.30892
- [138] Vajrabhaya, L., Korsuwannawong, S., *Journal of Analytical Science and Technology*, **2018**, 9, 1-6, doi.: 10.1186/s40543-018-0146-0
- [139] Zabiszak, M., Frymark J., Nowak, M., Grajewski, J., Stachowiak, K., Kaczmarek, M., T., Jastrzab, R. *Molecules*, **2021**, 26, 5290, 1-20, doi: 10.3390/molecules26175290
- [140] Jastrzab, R., *Journal of Coordination Chemistry*, **2013**, 66, 98-113, doi.: 10.1080/00958972.2012.746678
- [141] Jastrzab, R., *Journal of Inorganic Chemistry*, **2009**, 103, 766-773, doi.: 10.1016/j.jinorgbio.2009.01.012
- [142] Glasoe, P., K., Long, F., A., *The Journal of Physical Chemistry*, **1960**, 64, 188–190, doi.: 10.1021/j100830a521

- [143] Jastrzab, R.; Lomozik, L., *Journal of Coordination Chemistry*, **2009**, 62, 710–720. doi: 10.1080/00958970802317855
- [144] Lomozik, L.; Jastrzab, R.; Gasowska, A., *Polyhedron*, **2000**, 19, 1145-1154, doi: 10.1016/S0277-5387(00)00375-2

9. Dorobek naukowy

Publikacje w czasopismach międzynarodowych

- Zabiszak, M., Frymark, J., Nowak, M., Grajewski, J., **Stachowiak, K.**, Kaczmarek, M.T., Jastrząb, R., *Influence of d-Electron Divalent Metal Ions in Complex Formation with L-Tartaric and L-Malic Acids*, *Molecules*, 2021, 26(17), 5290.
- Gabryel-Skordzka, M., Nowak, M., **Stachowiak, K.**, Zabiszak, M., Ogawa, K., Jastrząb, R., *The Influence of pH on Complexation Process of Copper(II) Phosphoethanolamine to Pyrimidine Nucleosides*, *Materials*, 2021, 14(15), 4309
- **Stachowiak, K.**, Zabiszak, M., Grajewski, J., Teubert, A., Bajek, A., Jastrząb, R., *Thermodynamic Studies of Complexes in Cu(II)/Uridine-5'-Diphosphoglucuronic Acid System*, *Molecules*, 2024, 29, 3695

Monografie

- **Stachowiak, K.**, Jastrząb, R., *Badanie reakcji kompleksowania w układzie jony miedzi(ii), urydyna, kwas glukuronowy. Kołodyńska Dorota (red.): Nauka i przemysł – lubelskie spotkania studenckie*, Wydawnictwo UMCS, ISBN 9788322795033, 2021, 70-73
- **Stachowiak, K.**, Zabiszak, M., Jastrząb, R., *Badanie reakcji kompleksowania w układzie jony miedzi(II), Urydyno-5'-monofosforan, kwas glukuronowy. Kołodyńska Dorota (red.): Nauka i Przemysł - lubelskie spotkania studenckie*, Wydawnictwo UMCS, 2022, 214-217, ISBN 978-83-227-9603-0
- **Stachowiak, K.**, Zabiszak, M., Jastrząb, R., *Badania termodynamiczne i spektroskopowe związków kompleksowych kwasu urydyno-5'-difosfoglukuronowego z jonami miedzi(II). Kołodyńska Dorota (red.): Nauka i Przemysł-lubelskie spotkania studenckie*, Wydawnictwo UMCS, 2023, 133-135, ISBN 978-83-227-9701-3
- **Stachowiak, K.**, Zabiszak, M., Jastrząb, R., *Badanie reakcji kompleksowania w układzie urydyno-5'-difosfoglukoza, jony miedzi(II). Kołodyńska Dorota (red.): Nauka i Przemysł-lubelskie spotkania studenckie*, Wydawnictwo UMCS, 2024, 119-122, ISBN 978-83-227-9806-5
- **Stachowiak, K.**, Zabiszak, M., Jastrząb, R., *Związki kompleksowe urydyno-5'-difosfo-N-acetyloglukozaminy z wybranymi jonami metali - badania*

potencjometryczne i spektroskopowe. Nauka i Przemysł-lubelskie spotkania studenckie, Wydawnictwo UMCS, 2025, 295-298, ISBN 978-83-227-9906-2

Konferencje naukowe krajowe i zagraniczne

- IX Ogólnopolskie Sympozjum „Nauka i Przemysł – lubelskie spotkania studenckie”, 28.06.2021r., Lublin – poster
- X Ogólnopolskie Sympozjum „Nauka i Przemysł – lubelskie spotkania studenckie”, 27.06.2022r., Lublin – wystąpienie ustne
- 44th International Conference on Coordination Chemistry, 28.08-2.09.2022, Rimini, Włochy – poster
- 64th Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego w Lublinie, 11.09-16.09.2022r., Lublin – poster
- XI Ogólnopolskie Sympozjum „Nauka i Przemysł – lubelskie spotkania studenckie”, 26.06.2023r., Lublin – wystąpienie ustne
- 65th Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego w Toruniu, 18.09-22.09.2023r., Toruń – poster
- XII Ogólnopolskie Sympozjum „Nauka i Przemysł – lubelskie spotkania studenckie”, 3.06.2024r., Lublin – wystąpienie ustne
- 17th European Biological Inorganic Chemistry Conference (EuroBIC-17), 25.08-29.08.2024r., Münste, Niemcy - poster
- „Od teorii do eksperymentu: w poszukiwaniu Świętego Graala w nauce 2”, 12.02.2025r., Wrocław – słuchacz
- Natural Science Baltic Conference, 10.05-11.05.2025r., Gdańsk, - poster
- XIII Ogólnopolskie Sympozjum „Nauka i Przemysł – lubelskie spotkania studenckie”, 9.06.2025r., Lublin – wystąpienie ustne

Staże naukowe i wyjazdy studyjne

- 18.02.-21.02.2019 – Dow Chemical Iberica Tarragona, Hiszpania (wizyta studyjna)
- 01.09.-30.09.2019 – Browar rzemieślniczy “Nepomucen”, Szkaradowo, Polska
- 20.02.-04.03.2024 – Centro Tecnológico de la Química de Cataluna, dr Bartosz Tylkowski, Tarragona, Hiszpania

- 07.2024 – Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Prof. dr hab. Anna Bajek, Bydgoszcz, Polska

Nagrody i wyróżnienia

- Stypendium rektora za wyniki w nauce (2017/2018; 2018/2019)
- Dyplom Maxima Cum Laude 2021 r.
- Najlepsza prezentacja ustna, XII Ogólnopolskie Sympozjum „Nauka i Przemysł - Lubelskie Spotkania Studenckie”, 03.06.2024r., Lublin

Finansowanie badań naukowych:

- Minigrant doktorancki, *Badanie reakcji kompleksowania cukrowych pochodnych urydyno-5'-difosforanu – charakterystyka spektralna oraz badania aktywności biologicznej*, **054/13/SNŚ/0034**, 1.11.2022-31.01.2024

Konkursy ID-UB:

- Wsparcie udziału naukowców i doktorantów w prestiżowych konferencjach naukowych, **058/06/POB3/0051**
- Wsparcie umiędzynarodowienia badań naukowych prowadzonych w Szkole Doktorskiej UAM, **115/13/UAM/0033**

Działalność popularno-naukowa:

- XXIV Poznański Festiwal Nauki i Sztuki – 8.11-19.11.2021
- XXV Poznański Festiwal Nauki i Sztuki – 31.05-04.06.2022
- Noc Naukowców – 30.09.2022
- XXVI Poznański Festiwal Nauki i Sztuki – 15.05-20.05.2023
- Festiwal Filmu Chemicznego “Cinema to Chemia” – 2.06.2023
- Noc Naukowców – 29.09.2023
- Dzień Kandydata na UAM – 27.10.2023
- XXVII Poznański Festiwal Nauki i Sztuki – 15.05-20.05.2024
- Festiwal Filmu Chemicznego “Cinema to Chemia” – 14.06.2024
- Noc Naukowców – 27.09.2024

Kursy i szkolenia

- Audytor wewnętrzny/pełnomocnik ISO9001 (16 godzin)
- Hazard Analysis and Critical Control Points System (HACCP)
- Język angielski w przemyśle chemicznym
- ChemDraw – oprogramowanie użyteczne w wielu wymiarach pracy chemika
- From the laboratory to the industry
- Główny technolog – zarządzanie produktem chemicznym
- Innowacyjne zastosowanie nieorganicznych związków chemicznych
- Kreowanie innowacyjnego produktu z komponentów ekologicznych.

10. Załączniki

Tekst publikacji przedstawionej w postępowaniu wraz z oświadczeniami współautorów:
Stachowiak, K., Zabiszak, M., Grajewski, J., Teubert, A., Bajek, A., Jastrząb, R.,
Thermodynamic Studies of Complexes in Cu(II)/Uridine-5'-Diphosphoglucuronic Acid System,
Molecules, 2024, 29, 3695, <https://doi.org/10.3390/molecules29153695>.

Article

Thermodynamic Studies of Complexes in Cu(II)/Uridine-5'-Diphosphoglucuronic Acid System

Klaudia Stachowiak ¹, Michał Zabiszak ¹, Jakub Grajewski ^{1,*}, Anna Teubert ², Anna Bajek ³
and Renata Jastrzab ^{1,*}

¹ Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University in Poznań, Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań, Poland; klasta5@amu.edu.pl (K.S.); zabiszakm@amu.edu.pl (M.Z.)

² Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Science, Zygmunt Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań, Poland; ateubert@ibch.poznan.pl

³ Faculty of Medicine, Department of Urology and Andrology, Collegium Medicum in Bydgoszcz, Nicolaus Copernicus University in Toruń, Jagiellońska 13, 85-067 Bydgoszcz, Poland; a.bajek@cm.umk.pl

* Correspondence: jakub.grajewski@amu.edu.pl (J.G.); renatad@amu.edu.pl (R.J.)

Abstract: A binary system of uridine-5'-diphosphoglucuronic acid with copper (II) ions was studied. Potentiometric studies in aqueous solutions using computer data analysis were carried out. The pH of dominance, the overall stability constants ($\log\beta$), and the equilibrium constants of the formation reaction ($\log K_e$) were determined for each complex compound formed in the studied system. Spectroscopic studies were carried out to determine the mode of coordination in the compounds studied. Cytotoxicity and metabolic activity tests of the compounds obtained showed an increase in the biological activity of the complexes tested against the free ligand. The current research may contribute to the knowledge of complex compounds of biomolecules found in the human body and may also contribute to the characterization of a group of complex compounds with potential anticancer properties.

Keywords: copper (II) ions; uridine derivatives; potentiometric measurements; spectroscopic studies; biological studies



Citation: Stachowiak, K.; Zabiszak, M.; Grajewski, J.; Teubert, A.; Bajek, A.; Jastrzab, R. Thermodynamic Studies of Complexes in Cu(II)/Uridine-5'-Diphosphoglucuronic Acid System. *Molecules* **2024**, *29*, 3695. <https://doi.org/10.3390/molecules29153695>

Academic Editor: Claudia Dragonetti

Received: 5 July 2024

Revised: 28 July 2024

Accepted: 2 August 2024

Published: 4 August 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Changes in the concentration of glycans and differences in their structure on the surface of cells are important for diagnosing developing cancer or infection in the body. Compounds that regulate the level of glycans in the organism are sugar derivatives of uridine diphosphate. These derivatives are also necessary for the synthesis of glycans. Due to their properties, these compounds may constitute a new group of anticancer drugs [1–6].

An important trace element in living organisms is the copper (II) ion, which can be found in the brain, liver, or bones. Copper (II) ions are part of many enzymes, including cytochrome c oxidase, peroxidase, tyrosinase, and lysyl oxidase. Furthermore, these ions are involved in the synthesis of hemoglobin and melanin [7–9]. Copper (II) ion concentration disorders can cause diseases such as anemia, osteoporosis, Parkinson's disease, hernias, Menkes syndrome, Hodgkin's disease, leukemia, and general weakness [7,8,10]. Disorders of copper homeostasis in the brain play an important role in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD). Cu²⁺ binds to β -amyloid peptides, increasing their toxicity to cells. Moreover, the binding of metal ions to the peptide accelerates its aggregation, resulting in the neuronal damage characteristic of AD [11,12].

Nucleotides and nucleosides, as the basic building units of nucleic acids, are essential for the proper functioning of the human body. Both of them participate in the synthesis of lipids and the metabolism of carbohydrates and are components of many coenzymes [13–16]. One of the representatives of pyrimidine nucleosides is uridine, which

is composed of sugar ribose and uracil. It is necessary in the process of RNA and glycogen synthesis and is a precursor of uridine phosphates. Uridine and its derivatives support the proper functioning of the central nervous system. Uridine-5'-triphosphate (UTP) is used during glycogen synthesis to produce uridine-5'-diphosphate glucose (UDP-glucose) [17–21]. Interactions of uridine and its derivatives with metal ions are important for processes in the body. A potential coordination site in the nucleoside molecule is the endocyclic nitrogen atom N(3), which is deprotonated at higher pH values. The high basicity of this donor atom promotes the formation of connections with other biomolecules that have donor atoms with lower basicity in their structures. Additional coordination sites in nucleotide molecules are the oxygen atoms of phosphate residues [15,22].

Nucleic acid bases can exist in several different forms of tautomerism. In molecules of nucleic acid bases, keto-enol and amino-imino tautomerism can occur. The formation of tautomeric forms is related to the presence of protons capable of migration in the molecules of these organic substances. The appearance of tautomeric forms is important, e.g., in pharmacy, chemistry, and physics. In addition, the formation of different tautomeric forms can influence the structural and chemical diversity of these compounds and thus their biological function. Therefore, replacing one nuclear base with its tautomer can result in an incorrect base pair, causing an error in the genetic code or a mutation [22–24].

D-glucuronic acid (GluA), classified as uronic acids, contains a carboxyl, hydroxyl, and pseudo-aldehyde group in its structure and is obtained in the process of dehydrogenation of UDP-glucose [25–27]. These compounds play an important role in the glucuronidation process. This process allows the removal of compounds such as bilirubin, xenobiotics, and steroid hormones from the organism [25,28]. The presence of two functional groups, carboxyl and hydroxyl, in the D-glucuronic acid molecule promotes the formation of metal-ligand complex compounds. Ligands such as D-glucuronic acid can be used as masking agents for various metals, including toxic metals [27,29,30].

Uridine-5'-diphosphoglucuronic acid (UDP-GluA), which is found in the liver and kidney, plays an important role in reactions catalyzed by UDP-glucuronyltransferases (UGT), and its synthesis is catalyzed by UDP-glucose dehydrogenase. UGTs are a group of enzymes involved in the detoxification process of a living organism. These enzymes catalyze the glucuronidation of potentially toxic and carcinogenic metabolic products such as cannabinoids and such compounds as thyroxine, some bile acids, morphine, and acetaminophen [31,32].

The following article presents the results of potentiometric and spectroscopic studies on the formation of complex compounds in the system of uridine-5'-diphosphoglucuronic acid and copper (II) ions. The internal coordination sphere in the obtained complexes was also determined. Furthermore, the antitumor properties of the obtained complexes were investigated. The current research may contribute to the knowledge of complex compounds of biomolecules found in the human body and may also contribute to the characterization of a group of complex compounds with potential anticancer properties.

2. Results and Discussion

2.1. Protonation of the Ligand

The analysis of the potentiometric studies confirmed the presence of three protonated forms of the ligand, (UDP-GluA)H, (UDP-GluA)H₂, and (UDP-GluA)H₃, in the system studied. The protonation constants of these forms and their formation reactions are given in Table 1. The structural formula of the studied ligand with a highlighted potential coordination site is shown in Figure 1.

In the pH range studied, the carboxylic group of D-glucuronic acid, the nitrogen atom in the uridine ring, and one of the phosphate residues are deprotonated and considered potential coordination centers.

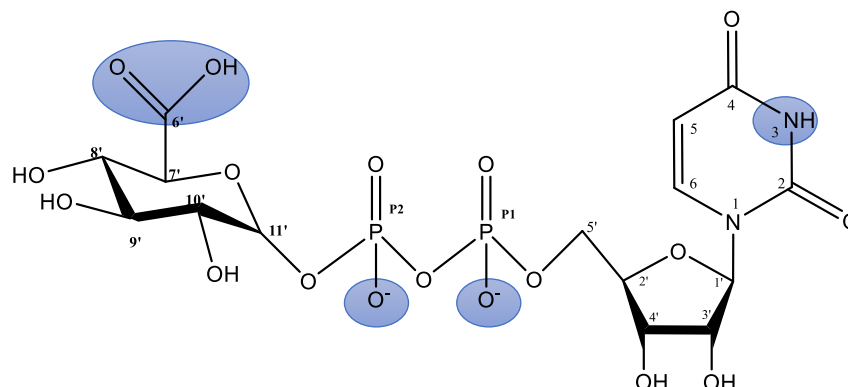


Figure 1. Formula of the uridine-5'-diphosphoglucuronic acid (highlighted with blue background indicate the potential coordination sites in the ligand molecule).

Table 1. The protonation constant ($\log\beta$) of uridine-5'-diphosphoglucuronic acid and the equilibrium constant of formation ($\log K_e$) (standard deviations are given in parentheses).

Species	$\log\beta$ [33]	$\log K_e$	Reaction
(UDP-GluA)H	8.66(2); 9.40 [33]	8.66	$(\text{UDP-GluA})^{4-} + \text{H}^+ \rightleftharpoons (\text{UDP-GluA})\text{H}^{3-}$
(UDP-GluA)H ₂	11.67(4); 12.79 [33]	3.01	$(\text{UDP-GluA})\text{H}^{3-} + \text{H}^+ \rightleftharpoons (\text{UDP-GluA})\text{H}_2^{2-}$
(UDP-GluA)H ₃	13.85(5); 14.19 [33]	2.17	$(\text{UDP-GluA})\text{H}_2^{2-} + \text{H}^+ \rightleftharpoons (\text{UDP-GluA})\text{H}_3^{-}$

The deprotonation of the $-\text{O-PO}_3\text{H}^-$ group ($\log\beta = 13.82$, $\log K_e = 2.17$) and the $-\text{COOH}$ group ($\log\beta = 11.65$, $\log K_e = 3.01$) starts at a pH value lower than the study range. The partially protonated form occurs in the system up to a pH value of about 5.5. The deprotonation process of the proton of $-\text{N}(3)\text{H}$ ($\log\beta = 8.64$, $\log K_e = 8.64$) begins below the test scale. This form is present in solution up to a pH of about 9.5 and at its maximum represents approximately 100% of all forms in the system. At a pH above 9.5, the system is dominated by the fully deprotonated form of the ligand (Figure 2).

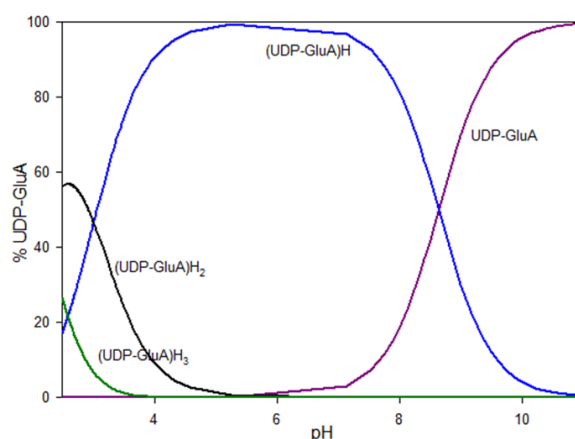


Figure 2. Distribution diagram of the protonation of UDP-GluA.

At high pH values, when a proton from $-\text{N}(3)\text{H}$ is deprotonated, lactam–lactim tautomerism occurs due to the alkaline medium. As a result of tautomerism, the free electron pair from the nitrogen atom migrate, causing the formation of a double bond between the C4 carbon atom and the nitrogen atom. The formation of the double bond causes an electron pair to leave the bond between the carbon atom C4 and the oxygen atom and migrates this pair to the oxygen atom (Figure 3).

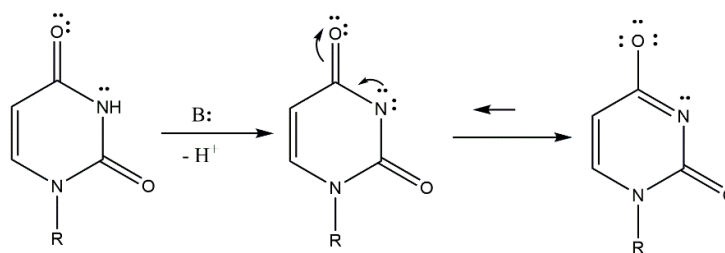


Figure 3. Lactam–lactim tautomerism in alkaline medium.

2.2. Binary System of Copper (II) Ion/Uridine-5'-Diphosphoglucuronic Acid

Computer analysis of the potentiometric measurements confirmed the presence of two protonated forms and two hydroxocomplexes: $\text{Cu}(\text{UDP-GluA})\text{H}_2$, $\text{Cu}(\text{UDP-GluA})\text{H}$, $\text{Cu}(\text{UDP-GluA})(\text{OH})$, and $\text{Cu}(\text{UDP-GluA})(\text{OH})_3$. The stability constants ($\log\beta$), equilibrium constants of formation ($\log K_e$), and examples of complex formation are presented in Table 2.

Table 2. The overall stability constants ($\log\beta$) and the equilibrium constants of formation ($\log K_e$) of the complexes formed in the studied system (standard deviations are given in parentheses).

Species	$\log\beta$	$\log K_e$	Reaction
$\text{Cu}(\text{UDP-GluA})\text{H}_2$	15.61(3)	3.94	$\text{Cu}^{2+} + (\text{UDP-GluA})\text{H}_2 \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{UDP-GluA})\text{H}_2$
$\text{Cu}(\text{UDP-GluA})\text{H}$	12.52(2)	3.86	$\text{Cu}^{2+} + (\text{UDP-GluA})\text{H} \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{UDP-GluA})\text{H}$
$\text{Cu}(\text{UDP-GluA})(\text{OH})$	−0.78(2)	12.98	$\text{Cu}^{2+} + (\text{UDP-GluA}) + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{UDP-GluA})(\text{OH}) + \text{H}^+$
$\text{Cu}(\text{UDP-GluA})(\text{OH})_3$	−20.87(3)	7.45	$\text{Cu}(\text{UDP-GluA})(\text{OH}) + 2\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{UDP-GluA})(\text{OH})_3 + 2\text{H}^+$

The correctness of the assumed model was determined by comparing the theoretical computer-generated curve and the experimental curve. The experimental and theoretical curves correspond practically over the entire range, which proves the correctness of the assumed model. The sigma parameter for the adopted model is 12.405.

Complex $\text{Cu}(\text{UDP-GluA})\text{H}_2$ starts forming at a pH below 2.5 (Figure 4). This form dominates at a pH value of approximately 2.5 and binds about 55% of the copper (II) ions. $\text{Cu}(\text{UDP-GluA})\text{H}$ starts forming at a pH value below 2.5. The protonated form dominates at pH 5.0–5.5 and binds maximally to 70% of copper (II) ions. The first hydroxy complex $\text{Cu}(\text{UDP-GluA})(\text{OH})$ starts to form at pH 5.5 and dominates at pH values of about 8.0, where it binds approximately 65% of Cu^{2+} . At pH 8.0, the last complex form starts forming: $\text{Cu}(\text{UDP-GluA})(\text{OH})_3$. This complex dominates at a pH value above the test range. At a pH of about 10.5, this hydroxy complex binds about 55% of copper (II) ions.

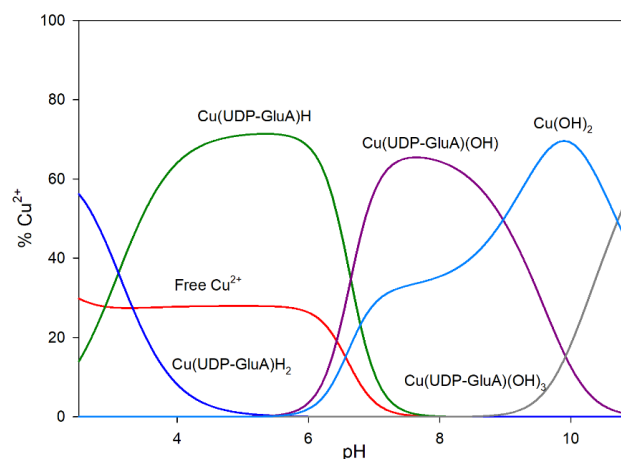


Figure 4. Distribution diagram of the $\text{Cu}(\text{II})/(\text{UDP-GluA})$ system (ratio 1:1); $C_{\text{Cu}^{2+}} = C_L = 1 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$.

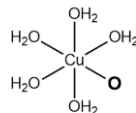
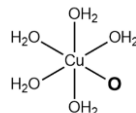
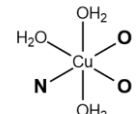
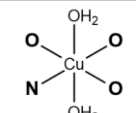
The simple form of Cu(UDP-Glc) and the hydroxocomplex Cu(UDP-Glc)(OH)₂ are most likely formed in the system under study at very low concentrations, which did not allow their identification during potentiometric tests and computer analysis.

2.3. Spectroscopic Studies

2.3.1. UV-Vis and EPR Spectroscopy

Spectroscopic methods were used to analyze the forming complex compounds. UV-Vis and EPR measurements were performed at pH values that provided the highest percentage of a given form. These pH values were selected on the basis of distribution curves. The obtained spectroscopic parameters are summarized in Table 3. The chromophore types given in this table were determined on the basis of literature data and the results obtained and represent the possible coordination sites in the complex compounds studied.

Table 3. UV-Vis and EPR spectroscopic parameters for the formation of complex forms.

Species	pH	$g_{\parallel}$	$A_{\parallel}$ [cm ⁻¹]	$\lambda_{\max}$ [nm]	ϵ [M ⁻¹ cm ¹]	Abs.	Chromophore	Proposed Mode of Coordination
Cu(UDP-GluA)H ₂	2.5	2.39	136×10^{-4}	810	23	0.023	{1O}	
Cu(UDP-GluA)H	5.0	2.37	145×10^{-4}	800	30	0.030	{1O}	
Cu(UDP-GluA)(OH)	8.0	-	-	710	93	0.093	{1N, 2O}	
Cu(UDP-GluA)(OH) ₃	10.5	-	-	690	112	0.112	{1N, 3O}	

The change in the internal coordination sphere in complexes containing copper (II) ions is associated with a shift in absorbance towards lower wavelengths (Figure 5). For the Cu(UDP-GluA)H₂ and Cu(UDP-GluA)H complexes, coordination occurs through one oxygen atom derived from the glucuronic acid moiety or phosphate group. With increasing pH values, nitrogen in the UDP-GluA molecule is deprotonated and a coordination bond is formed with this donor atom. For the Cu(UDP-GluA)(OH) complex, coordination occurs through a nitrogen atom derived from the UDP molecule and two oxygen atoms derived from the glucuronic acid molecule and phosphate group of the UDP molecule. The internal coordination sphere of the last complex form from the studied system includes a nitrogen atom N(3) derived from the UDP molecule and three oxygen atoms derived from carbonyl group -COOH of glucuronic acid and two phosphate residues -O-PO₃H.

On the basis of EPR spectra analysis, the formation of monomeric complex forms in the studied system was confirmed, and characteristic spectra for copper (II) ions were observed (Figure 6). The spectral parameters $g_{\parallel} = 2.39$ and $A_{\parallel} = 136 \times 10^{-4}$ cm⁻¹ for the Cu(UDP-GluA)H₂ complex and $g_{\parallel} = 2.37$ and $A_{\parallel} = 145 \times 10^{-4}$ cm⁻¹ for the Cu(UDP-GluA)H complex indicate the participation of one oxygen atom in the formation of the coordination bond. The EPR spectra obtained are analogous due to the similar coordination mode in the compounds analyzed.

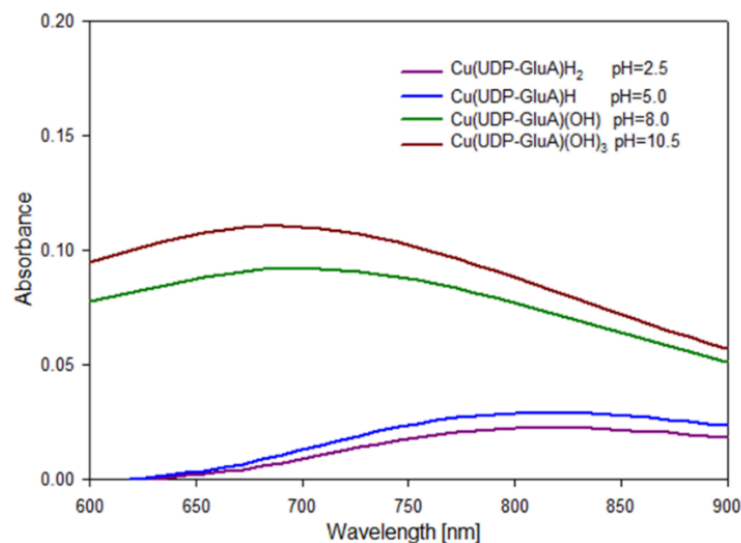


Figure 5. UV-Vis spectrum of the Cu(II)/(UDP-GluA) system.

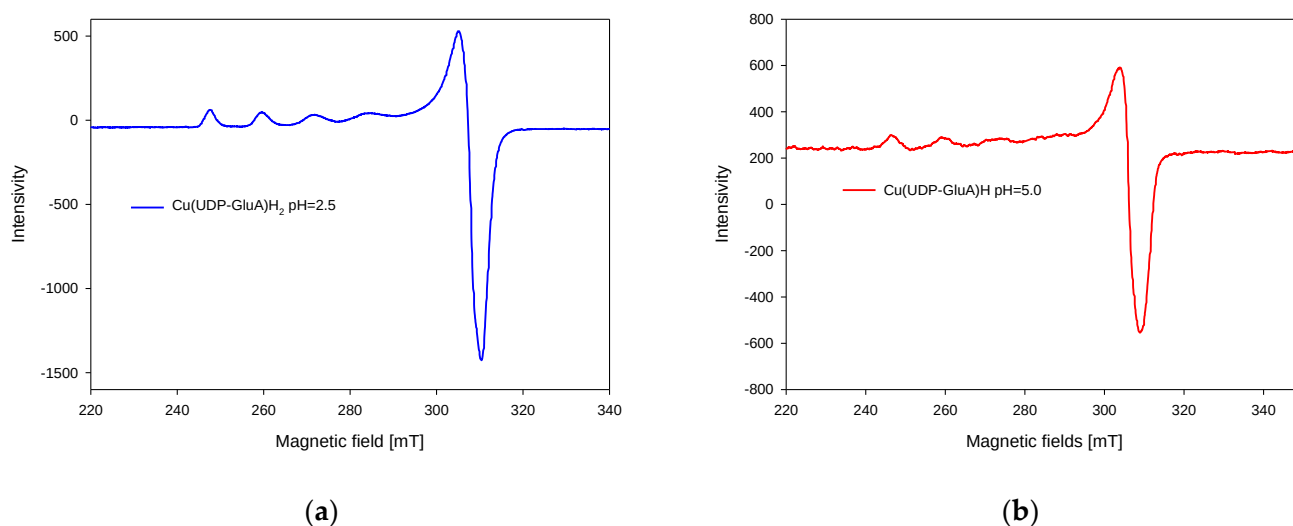


Figure 6. EPR spectra of (a) Cu(UDP-GluA)H₂, (b) Cu(UDP-GluA)H.

Tests were not carried out for forms formed at pH = 8.0 and pH = 10.5, due to sediment formation in the prepared samples.

2.3.2. CD Spectroscopy

The first series of CD measurements was carried on uridine-5'-diphosphoglucuronic acid at different pH values to exclude protonation/deprotonation effects on the conformation of the ligand. Based on the results of potentiometric studies, pH 3.0 and 10.0 were chosen. The results of these measurements show that there is no significant change in CD spectra in the range of 250–280 nm, which originates from the absorption of the uridine base. The maximum observed for the acidic solution is $\Delta\epsilon = 3.81$ at 269 nm and $\Delta\epsilon = 4.29$ at 266 for the basic one. In the short-wave part of the spectra, a negative Cotton effect can be observed for the sample in the basic solution. This result is usually related [34,35] to the deprotonation of chiral carboxylic acid, which shifts the $n\text{-}\pi^*$ transition and CD maxima towards shorter wavelengths ($\Delta\epsilon = -0.84$ at 228 nm for the acidic solution nm and $\Delta\epsilon = -2.14$ at 216 nm for the basic one). The loaded CD spectra for both solutions are presented in Figure 7 and indicate that the conformation of uridine-5'-diphosphoglucuronic acid is not pH-dependent in water solutions.

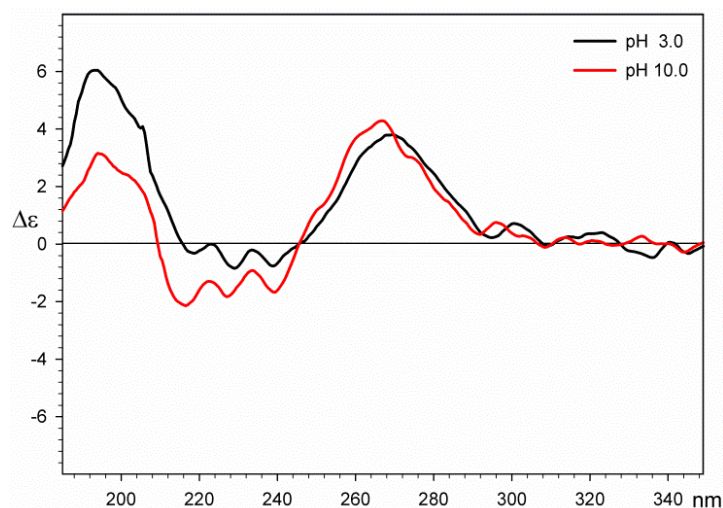


Figure 7. Circular dichroism spectra of uridine-5'-diphosphoglucuronic acid in water at pH = 3 (black line) and pH = 10.0 (red line).

As the uridine-5'-diphosphoglucuronic acid has many potential electron donor sites, the possible coordination of Cu(II) ions may take place by different parts of the ligand cause its conformational changes. These coordination modes may also vary due to pH changes. The CD measurements of the Cu(II)/UDP-GluA system were performed at a pH that was previously determined on the basis of potentiometric measurements knowing that the main form of the complex is usually present alongside other minor ones. In the case of measurements for all pH, the same sequence of Cotton effects is observed with a positive long-wave effect located in the range of 262–272 nm and negative Cotton effects located in the range of 218–239 nm. The main Cotton effects at a given wavelength are summarized in Table 4.

Table 4. Cotton effects for Cu(II)/UDP-GluA system in water solutions.

pH	2.5	5.0	8.0	10.5
$\Delta\epsilon$ (nm)	2.98 (272)	2.91 (267)	2.85 (267)	4.21 (262)
	−0.95 (239)	−0.85 (239)	−0.70 (239)	−0.98 (237)
	−1.01 (224)	−1.11 (228)	−0.19 (227)	−1.94 (227)
		−1.15 (219)	−0.50 (219)	−2.70 (218)

The results indicate no substantial changes in the ligand conformation in the pH range of 2.5–8.0. The spectrum measured at pH = 10.5 has a more intense and blue-shifted maximum, which is in agreement with NMR shift measurements and may be associated with the change in donor atoms in the system. Additionally, this change can also be connected with the shift in equilibrium of base-promoted lactam–lactim tautomerization, which is also observed in the shift in the C4 signal in the ^{13}C NMR spectra. The negative Cotton effects in the range of 218–239 nm are derived from the interaction of the carboxylic acid residue with the chiral environment. As expected, there is a general tendency to increase the intensity of these effects and shift towards shorter wavelengths with increasing pH; however, the mutual proximity of positive Cotton effects of relatively high intensity may affect their height and location on the CD spectrum, which makes their precise interpretation difficult. CD spectra of the Cu(II)/UDP-GluA system are presented in Figure 8.

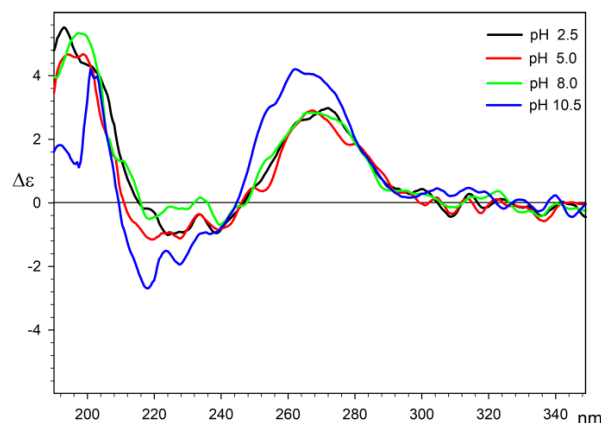


Figure 8. Circular dichroism spectra of the Cu(II) uridine-5'-diphosphoglucuronic acid system in water at pH = 2.5 (black line), pH = 5.0 (red line), pH = 8.0 (green line), and pH = 10.5 (blue line).

2.3.3. NMR Spectroscopy

NMR studies were conducted to determine the mode of coordination in the studied system. The studies were performed for ligands and complexes for two pH values. The results obtained are summarized in Table 5.

Table 5. Differences between ^{13}C NMR and ^{31}P NMR chemical shifts from the ligand in the Cu(UDP-GluA) system in relation to the free ligand [ppm].

System	pH	(UDP-GluA)				
		C2	C4	C6'	P1	P2
Cu(UDP-GluA)H	5.0	0.06	−0.03	0.20	−	7.93
Cu(UDP-GluA)(OH)	8.0	−0.05	−0.91	0.07	0.16	4.50

Analysis of ^{13}C NMR and ^{31}P NMR spectra revealed changes in the chemical shifts between the free ligand and the complex compound. At low pH values, changes in chemical shifts were observed in carbon C6' (0.20) derived from the glucuronic acid moiety and at the phosphorus atom P2 (7.93). At these pH values, coordination occurs between the oxygen atom of glucuronic acid and the oxygen atom of the phosphate group of the UDP moiety. This type of coordination occurs for the complex Cu(UDP-GluA)H. At higher pH values, changes in chemical shifts were observed at the C4 (−0.91) carbon atom and P2 (4.5) phosphorus atom of the UDP molecule and the C6' (−0.70) carbon atom of the glucuronic acid moiety. These changes are due to deprotonation of the nitrogen atom at higher pH values and the occurrence of lactam–lactim tautomerism. These changes explain the chemical shift in only the C4 carbon and not the C4 and C2 carbons in the ^{13}C NMR spectrum. At pH 8.0, coordination occurs through an oxygen atom located at the C4 carbon in the uridine ring and through one of the oxygen atoms of the phosphate group and an oxygen atom derived from the carbonyl group of D-glucuronic acid. A schematic of the lactam–lactim tautomerism is shown in Figure 9.

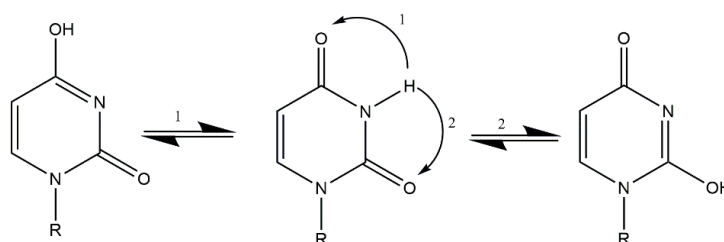


Figure 9. Lactam–lactim tautomerism in the uridine moiety and its derivatives [22].

2.3.4. Cytotoxicity and Metabolic Activity Tests

The IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration) is defined as the concentration of compound needed to inhibit a biological process or response by 50%. The metabolic activity of the cells after 24 h of incubation with tested compounds at pH 5 was similar (Figure 10). The same was true for IC₅₀ values (Table 6). However, after 72 h, a higher cytotoxicity could be observed for Cu UDP-GluA. A549 cells reduced their activity by 44.4% in comparison to the control, e.g., cells cultured in standard growth medium.

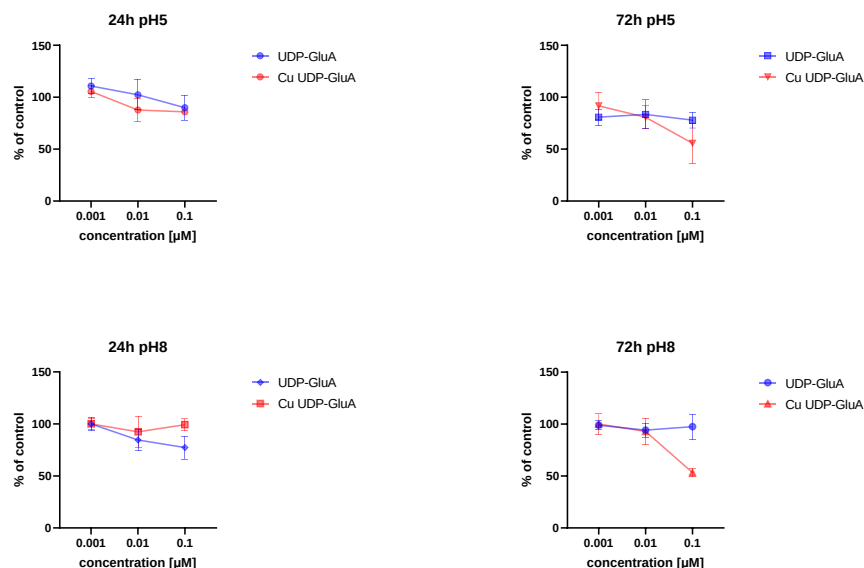


Figure 10. Cell viability after incubation with tested compounds for 24 h and 72 h in different pHs.

Table 6. IC₅₀ values [μM] calculated based on the MTT assay results.

Species	24 h	72 h
(UDP-GluA) pH5	0.317 ± 0.006	0.781 ± 0.005
Cu(UDP-GluA) pH5	0.377 ± 0.005	0.116 ± 0.005
(UDP-GluA) pH8	0.295 ± 0.004	n.d. *
Cu(UDP-GluA) pH8	1.719 ± 0.01	0.094 ± 0.004

* n.d.—not detectable, too low a cytotoxicity to calculate IC₅₀.

In turn, after 72 h of incubation with UDP-GluA at pH 8, no changes in the cells' metabolic activity could be detected; therefore, the IC₅₀ value could not be calculated. Cu(UDP-GluA) at pH 8 after 72 h of incubation reduced the A549 cell's metabolic activity by 52.2%. However, the effect was strongly time-dependent (Table 6).

3. Materials and Methods

3.1. Materials

Uridine-5'-diphosphoglucuronic acid trisodium salt was obtained from Sigma-Aldrich and copper (II) nitrate was obtained from Merck (Sigma-Aldrich Merck group, Burlington, MA, USA). All of these materials were used without purification.

3.2. Potentiometric Studies

Potentiometric titration was performed using a Titrando 713 Methrom equipped with an autoburette-combined glass electrode calibrated prior to each test (Methrom, Herisau, Switzerland). Calibration was performed prior to each titration with two buffer solutions of pH 4.002 and pH 9.225. All measurements were carried out under strictly defined conditions of a constant ionic strength of 0.1 M KNO₃, temperature of 20 ± 1 °C, an inert

gas atmosphere of helium (He 5.0 Ultra-High Purity), and a pH range of 2.5 to 11.0. The metal-to-ligand ratio was 1:1 and the concentration of ligands and copper (II) ions $[\text{Cu}^{2+}]$ was 0.001 mol/dm^3 . The protonation constant and the stability constant of the complex were determined using the HYPERQUAD 2008 program. The calculations allowed us to determine the model of complex formation in the systems studied. The correctness of the assumed model was verified by analyzing the standard deviations and the convergence of the experimental and theoretical curves [36].

3.3. UV-Vis Spectroscopy

UV-Vis spectroscopy studies were performed on a SHIMADZU UV-1900 spectrophotometer using the UVProbe program (SHIMADZU, Kyoto, Japan). Measurements were made in the wavelength range of 550 to 900 nm. The concentration of the metal ion was 0.001 mol/dm^3 and the metal-to-ligand molar ratios was 1:1. The data obtained with UVProbe were saved as a text file, and the spectra were produced with SigmaPlot 11.0.

3.4. EPR Spectroscopy

The EPR spectra were carried out at a temperature of -196°C , using glass capillary tubes, and recorded on an SE/X2457 Radiopan spectrometer. EPR studies were performed for copper (II) ion systems, in which the concentration of metal ions was 0.005 M in a solution of water/glycol of 3:1 with a metal–ligand ratio of 1:1.

3.5. NMR Spectroscopy

^{13}C and ^{31}P NMR spectroscopic measurements were recorded using a 400 MHz (9.39 T) AVANCE II Bruker NMR spectrometer (Bruker, Billerica, MA, USA). Investigations were performed for the ligand and complex forms formed at two pH values: $\text{pH} = 5.0$ and $\text{pH} = 8.0$. Samples were prepared by dissolving the corresponding reactants in D_2O and the pD values of each prepared sample were determined by NaOD and DCl taking into account the relation $\text{pD} = \text{pH} + 0.4$ [37]. The concentration of ligands in the samples was 0.05 mol/dm^3 and the M:L ratio was 1:100.

3.6. CD Spectroscopy

The CD and corresponding UV spectra were recorded on a JASCO J810 spectropolarimeter at ambient temperature (JASCO, Halifax, NS, Canada). Spectra were recorded in the range of 185–400 nm in water solutions and accumulated with four scans for both UDP-GluA and its copper (II) complexes. Water for the experiments was extra-purified by the Merck Millipore Simplicity UV apparatus to lower the absorbance especially in the short-wave part of the measuring range. The measurements were performed in N_2 gas atmosphere (flow 10 L/min) and the optical path length was 0.1 cm [38]. The concentrations of measured solutions were $1 \times 10^{-4} \text{ M}$, which allowed the absorbance to be maintained at an acceptable level.

3.7. Cell Line and Cell Culture

The A549 cell line was initially initiated through an explant culture of lung carcinoma tissue from a 58-year-old male. Cells were hypotriploid with a modal chromosome number of 66 in 24% of cells. As verified at ATCC, there were six markers present in single copies in all cells, e.g., $\text{der}(6)\text{t}(1;6) (\text{q11;q27})$, $\text{del}(6) (\text{p23})$, $\text{del}(11) (\text{q21})$, $\text{del}(2) (\text{q11})$, M4, and M5. Most cells have doubled sex chromosomes, single copies of N2 and N6 chromosomes, and four copies of N12 and N17 chromosomes.

Basic cell culture reagents and other materials were purchased from Corning. A549 cells were routinely cultured in F-12K medium supplemented with fetal bovine serum to a final concentration of 10%. They were maintained at 37°C in a humidified cell culture incubator (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) with 5% CO_2 at a concentration between 6×10^3 and 6×10^4 cells per cm^2 . The standard growth medium was changed two or three times a week.

3.8. MTT Assay

The assay allows for the detection of the cells' metabolic activity. It is based on the intracellular reduction in the water-soluble MTT reagent to an insoluble formazan by respiring cells. A549 cells were detached from the growth surface, counted, and transferred to 96-well plates at a density of 4.5×10^3 cells per cm^2 . After 24 h of preincubation in standard conditions, tested compounds were added, and cells were cultured for 24 or 72 h. The medium was discarded and cells were incubated with the MTT solution (1 mg/mL) for 1 h at 37 °C. Formed purple formazan crystals were dissolved in DMSO (StanLab, Lublin, Poland). The absorbance was read at OD 570 nm using a microplate reader Multiskan Sky (Thermo Fisher Scientific).

4. Conclusions

The formation of complexes in the binary system of uridine-5'-diphosphoglucuronic acid and copper (II) ions was established. The existence of two types of complex forms in the system was observed: MH_xL and $\text{ML}(\text{OH})_x$. Depending on the pH, different coordination modes were observed in the obtained complex compounds. The types of chromophores were determined by UV-Vis, EPR, and NMR spectroscopic studies. It was observed that, at low pH values, coordination occurs through an oxygen atom derived from the glucuronic acid molecule or phosphate group. As the pH increases, the nitrogen atom in the ligand molecule is deprotonated and a coordination bond is formed with this donor atom. Oxygen atoms derived from UDP phosphate residues also play an important role in the coordination process. The bioassays carried out showed an increase in the biological activity of the complex compounds tested against the free ligand. As the incubation time increases, the biological activity of the tested compounds increases.

Author Contributions: Conceptualization, K.S. and M.Z.; methodology, K.S., M.Z., J.G. and R.J.; validation, M.Z. and R.J.; formal analysis, M.Z. and J.G.; investigation, K.S., J.G., A.T. and A.B.; writing—original draft preparation, K.S.; visualization, K.S.; supervision, R.J., M.Z. and K.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

Abbreviations

UDP-GluA, Uridine-5'-diphosphoglucuronic acid.

References

1. Varki, A. Biological role of glycans. *Glycobiology* **2017**, *27*, 3–49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Fuster, M.M.; Esko, J.D. The Sweet and Sour of Cancer: Glycans as Novel Therapeutic Targets. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 526–542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Dube, D.H.; Bertozzi, C.R. Glycans in cancer and inflammation—Potential for therapeutics and diagnostics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 477–488. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Schachter, H. Biosynthetic controls that determine the branching and microheterogeneity of protein-bound oligosaccharides. *Biochem. Cell Biol.* **1986**, *64*, 163–181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Dennis, J.W.; Nabi, I.R.; Demetriou, M. Metabolism, Cell Surface Organization, and Disease. *Cell* **2009**, *139*, 1229–1241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Brewer, C.F.; Miceli, M.C.; Baum, L.G. Clusters, bundles, arrays, and lattices: Novel mechanisms for lectin–saccharide-mediated cellular interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 616–623. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

7. Angelova, M.; Asenova, S.; Nedkova, V.; Koleva-Kolarova, R. Copper in the human organism. *Tarika J. Sci.* **2011**, *9*, 88–98.
8. Osredkar, J.; Sustar, N. Copper and Zinc, Biological Role and Significance of Copper/Zinc Imbalance. *J. Clin. Toxicol.* **2011**, *3*, 1–18. [[CrossRef](#)]
9. Hoffmann, S.K.; Goslar, J.; Bregier-Jarzebowska, R.; Gasowska, A.; Zalewska, A.; Lomozik, L. Copper(II) ions interactions in the system with triamines and ATP. *J. Inorg. Biochem.* **2017**, *177*, 89–100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Horodyjewska, A.; Popiolek, L.; Kocot, J. The many “faces” of copper in medicine and treatment. *Biometals* **2014**, *27*, 611–621. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Hung, Y.H.; Bush, A.I.; Cherny, R.A. Copper in the brain and Alzheimer’s disease. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2010**, *15*, 61–76. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Bagheri, S.; Squitti, R.; Haertle, T.; Siotto, M.; Saboury, A.A. Role of Copper in the Onset of Alzheimer’s Disease Compared to Other Metals. *Front. Aging Neurosci.* **2018**, *9*, 446. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Kaczkowski, J. *Podstawy Biochemii*, 15th ed.; Wydawnictwo Naukowe PWN: Warszawa, Poland, 2017; pp. 173–215.
14. Belmont, P.; Constant, J.F.; Demeunynck, M. Nucleic acid conformation diversity: From structure to function and regulation. *R. Soc. Chem.* **2001**, *30*, 70–81. [[CrossRef](#)]
15. Lomozik, L.; Jastrzab, R. Interference of Copper(II) ions with Non-covalent Interactions in Uridine or Uridine 5'-Monophosphate Systems with Adenosine, Cytidine, Thymidine and their Monophosphates in Aqueous Solution. *J. Solut. Chem.* **2007**, *36*, 357–374. [[CrossRef](#)]
16. Saenger, W. Structure and Function of Nucleosides and Nucleotides. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1973**, *12*, 591–601. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Yamamoto, T.; Koyama, H.; Kurajoh, M.; Shoji, T.; Tsutsumi, Z.; Moriwaki, Y. Biochemistry of uridine in plasma. *Clin. Chim. Acta* **2011**, *412*, 1712–1724. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Dobolyi, A.; Juhasz, G.; Kovacs, Z.; Kardos, J. Uridine Function in the Central Nervous System. *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, *11*, 1058–1067. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Cansev, M. Uridine and cytidine in the brain: Their transport and utilization. *Brain Res. Rev.* **2006**, *52*, 389–397. [[CrossRef](#)]
20. Berg, J.M.; Tymoczko, J.L.; Stryer, L. *Biochemistry*, 5th ed.; W.H. Freeman and Company: New York, NY, USA, 2002; pp. 865–870.
21. Zhang, N.; Yin, Y.; Xu, J.S.; Chen, W.S. 5-Fluorouracil: Mechanisms of Resistance and Reversal Strategies. *Molecules* **2008**, *13*, 1551–1569. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Lomozik, L.; Jastrzab, R.; Gasowska, A. Interactions in binary and ternary systems including Cu(II), uridine, uridine-5'-monophosphate or diamine. *Polyhedron* **2000**, *19*, 1145–1154. [[CrossRef](#)]
23. Wojnarowska, Z.; Paluch, M.; Wlodarczyk, P.; Dulski, M.; Wrzalik, R.; Roland, C.M. Tracking of Proton Transfer Reaction in Supercooled RNA Nucleoside. *J. Physical Chem. Lett.* **2012**, *3*, 2288–2292. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Fedeles, B.I.; Li, D.; Singh, V. Structural Insights into Tautomeric Dynamics in Nucleic Acids and in Antiviral Nucleoside Analogs. *Front. Mol. Biosci.* **2022**, *8*, 823253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Singh, V.; Fedeles, B.I.; Essigmann, J.M. Role of Tautomerism in RNA Biochemistry. *RNA* **2015**, *21*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Vina, I.; Linde, R.; Patetko, A.; Sejmonows, P. Glucuronic acid from fermented beverages: Biochemical functions in humans and its role in health protection. *IJRRAS* **2013**, *14*, 217–230.
27. Dutton, G.J. *Glucuronic Acid Free and Combined*; Academic Press: New York, NY, USA; London, UK, 1966; pp. 1–631.
28. Jastrzab, R.; Nowak, M.; Skrobanska, M.; Zabiszak, M. Complexation copper(II) or magnesium ions with D-glucuronic acid—Potentiometric, spectral and theoretical studies. *J. Coord. Chem.* **2016**, *69*, 2174–2181. [[CrossRef](#)]
29. Vina, I.; Sejmonows, P.; Linde, R.; Patetko, A. Glucuronic acid containing fermented functional beverages produced by natural yeasts and bacteria associations. *IJRRAS* **2013**, *14*, 17–25.
30. Richel, A.; Laurent, P.; Wathelet, B.; Wathelet, J.; Paquot, M. Microwave-assisted synthesis of D-glucuronic acid derivatives using cost-effective solid acid catalysts. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 1356–1360. [[CrossRef](#)]
31. Ferrari, E.; Grandi, R.; Lazzari, S.; Saladini, M. Hg(II)-coordination by sugar-acids: Role of the hydroxyl groups. *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 2381–2386. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Capiello, M.; Giuliani, L.; Rane, A.; Pacifici, G.M. Uridine-5'-diphosphoglucuronic acid (UDPGlcUA) in the human fetal liver, kidney and placenta. *Eur. J. Drug Pharmacokinet.* **2000**, *25*, 161–163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Hauser, S.C.; Ziurys, J.C.; Gollan, J.L. A membrane transporter mediates access of uridine 5'-diphosphoglucuronic acid from the cytosol into the endoplasmic reticulum of rat hepatocytes: Implications for glucuronidation reactions. *Biochem. Biophys. Acta* **1988**, *967*, 149–157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Jastrzab, R.; Lomozik, L. Coordination mode in the binary systems of copper(II)/O-phospho-L-serine. *J. Coord. Chem.* **2009**, *62*, 710–720. [[CrossRef](#)]
35. Glasoe, P.K.; Long, F.A. Use of glass electrodes to measure acidities in deuterium oxide. *J. Phys. Chem.* **1960**, *64*, 188–190. [[CrossRef](#)]
36. Garribba, E.; Lodyga-Chruscinska, E.; Sanna, D.; Micera, G. Oxovanadium(IV) binding to ligands containing donor sites of biological relevance. *Inorganica Chim. Acta* **2001**, *322*, 87–98. [[CrossRef](#)]

37. Kacprzak, K.; Grajewski, J.; Gawronski, J. Indicator displacement sensor for efficient determination of α -hydroxydicarboxylic acids and their chiral discrimination. *Tetrahedron Asymmetry* **2006**, *17*, 1332–1336. [[CrossRef](#)]
38. Hoffmann, M.; Grajewski, J.; Gawronski, J. Extending the applications of circular dichroism in structure elucidation: Aqueous environment breaks the symmetry of tartrate dianion. *New J. Chem.* **2010**, *34*, 2020–2026. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Poznań, 16.06.2025 r.

mgr Klaudia Stachowiak

Zakład Chemii Koordynacyjnej

Wydział Chemii UAM

ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8

61-614 Poznań

Oświadczenie autora pracy

Oświadczam, że w poniższym artykule:

1. Stachowiak, K., Zabiszak, M., Grajewski, J., Teubert, A., Bajek, A., Jastrzab, R., *Thermodynamic Studies of Complexes in Cu(II)/Uridine-5'-Diphosphoglucuronic Acid System, Molecules*, **2024**, 29, 3695.

mój udział w pracy obejmował:

- Przygotowanie serii miareczkowań potencjometrycznych dla badanego układu Cu(II)/UDP-GluA
- Przygotowanie próbek do badań spektroskopowych UV-Vis, EPR, NMR oraz CD
- Przygotowanie próbek do badań biologicznych
- Rejestracja widm UV-Vis
- Opracowanie wyników badań z miareczkowania potencjometrycznego oraz spektroskopii UV-Vis, EPR, ^{13}C NMR, ^{31}P NMR
- Współudział w przygotowaniu publikacji
- Przygotowanie grafik do publikacji
- Współudział w opracowaniu koncepcji badawczej i metodologii prowadzonych badań
- Współudział w analizie i interpretacji otrzymanych wyników

Klaudia Stachowiak

Poznań, 16.06.2025 r.

Prof. dr hab. Renata Jastrząb
Zakład Chemii Koordynacyjnej
Wydział Chemii UAM
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8
61-614 Poznań

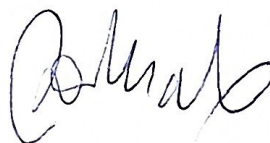
Oświadczenie promotora

Oświadczam, że w poniższym artykule:

1. Stachowiak, K., Zabiszak, M., Grajewski, J., Teubert, A., Bajek, A., Jastrząb, R.,
*Thermodynamic Studies of Complexes in Cu(II)/Uridine-5'-Diphosphoglucuronic Acid
System, Molecules, 2024, 29, 3695.*

Byłam opiekunem naukowym i promotorem pracy doktorskiej mgr Klaudii Stachowiak, a mój wkład własny w pracy obejmował:

- Nadzór na realizacją prowadzonych badań
- Przeprowadzenie pomiarów spektroskopii EPR
- Współudział w opracowaniu koncepcji badawczej i metodologii prowadzonych badań
- Współudział w analizie i interpretacji otrzymanych wyników
- Weryfikację i korektę manuskryptu
- Współudział w korespondencji z edytorem i recenzentami



Poznań, 11.06.2025 r.

dr Michał Zabiszak

Zakład Chemii Koordynacyjnej

Wydział Chemii UAM

ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8

61-614 Poznań

Oświadczenie promotora pomocniczego

Oświadczam, że w poniższym artykule:

2. Stachowiak, K., Zabiszak, M., Grajewski, J., Teubert, A., Bajek, A., Jastrząb, R.,
Thermodynamic Studies of Complexes in Cu(II)/Uridine-5'-Diphosphoglucuronic Acid System, Molecules, **2024**, 29, 3695.

Byłem promotorem pomocniczym pracy doktorskiej mgr Klaudii Stachowiak, a mój wkład własny w pracy obejmował:

- Nadzór na realizacją prowadzonych badań
- Współudział w przygotowaniu publikacji
- Współudział w opracowaniu koncepcji badawczej i metodologii prowadzonych badań
- Współudział w analizie i interpretacji otrzymanych wyników
- Weryfikację i korektę manuskryptu

Michał Zabiszak

Poznań, 16.06.2025 r.

dr hab. Jakub Grajewski

Zakład Stereochemii Organicznej

Wydział Chemii UAM

ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8

61-614 Poznań

Oświadczenie współautora

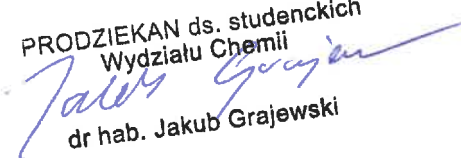
Oświadczam, że w poniższym artykule:

1. Stachowiak, K., Zabiszak, M., Grajewski, J., Teubert, A., Bajek, A., Jastrząb, R., *Thermodynamic Studies of Complexes in Cu(II)/Uridine-5'-Diphosphoglucuronic Acid System, Molecules*, **2024**, 29, 3695.

mój udział własny obejmował:

- Przeprowadzenie pomiarów spektroskopowych CD dla kwasu urydyno-5'-difosfoglukuronowego i jego związków kompleksowych z jonami miedzi(II)
- Opracowanie otrzymanych wyników z badań spektroskopowych CD
- Współudział w przygotowaniu publikacji
- Współudział w opracowaniu metodologii prowadzonych badań
- Współudział w korespondencji z edytorem i recenzentami

PRODZIEKAN ds. studenckich
Wydziału Chemii


dr hab. Jakub Grajewski

Poznań, 16.06.2025 r.

Prof. dr hab. Anna Bajek
Katedra Onkologii
Wydział Nauk o Zdrowiu
Collegium Medicum UMK
ul. Jagiellońska 15
85-067 Bydgoszcz

Oświadczenie współautora

Oświadczam, że w poniższym artykule:

1. Stachowiak, K., Zabiszak, M., Grajewski, J., Teubert, A., Bajek, A., Jastrząb, R.,
*Thermodynamic Studies of Complexes in Cu(II)/Uridine-5'-Diphosphoglucuronic Acid
System, Molecules, 2024, 29, 3695.*

mój udział własny obejmował:

- Przeprowadzenie badań biologicznych dla analizowanych ligandów (kwasu urydyno-5'-difosfoglukuronowego, urydyno-5'-difosfo-N-acetyloglukozaminy) oraz wybranych związków kompleksowych tych ligandów z jonami miedzi(II)
- Opracowanie otrzymanych wyników z badań biologicznych
- Współudział w przygotowaniu publikacji naukowej



PODPIS ZAUFANY

ANNA KAROLINA
BAJEK

16.06.2025 10:04:33 (GMT+2)

Dokument podpisany elektronicznie
podpisem zaufanym

Poznań, 16.06.2025 r.

mgr Anna Teubert
Pracownia NMR
ICHB PAN
ul. Z. Noskowskiego 12/14
61-704 Poznań

Oświadczenie współautora

Oświadczam, że w poniższym artykule:

1. Stachowiak, K., Zabiszak, M., Grajewski, J., Teubert, A., Bajek, A., Jastrząb, R.,
*Thermodynamic Studies of Complexes in Cu(II)/Uridine-5'-Diphosphoglucuronic Acid
System, Molecules*, **2024**, 29, 3695.

mój udział własny obejmował:

- Przeprowadzenie badań spektroskopowych NMR dla kwasu urydino-5'-difosfoglukuronowego i jego związków kompleksowych z jonami miedzi(II)

