

Ćwiczenie 2

Prowadzący: prof. UG, dr hab. Dagmara Jacewicz

Temat: Badania kinetyczne i zaproponowanie mechanizmu reakcji wychwytu CO₂ przez związki koordynacyjne metali przejściowych (model chemiczny reakcji) metodą „stopped-flow”.

PRZEGLĄD LITERATUROWY

1. Wprowadzenie
2. Połączenia Cr(III) jako związki biologicznie czynne
3. Oddziaływanie chromu(III) ze składnikami komórek
4. Mutagenność związków chromu(III)
5. Równowaga i trwałość CO₂ w roztworze
6. Obecność CO₂ w układach biologicznych
7. Metody przepływowe
8. Spektrofotometryczna technika *stopped-flow* w badaniach kinetyki reakcji chemicznych

ZAKRES I CEL ĆWICZENIA

CZEŚĆ LABORATORYJNA

dr Dagmara Jacewicz

1. Wprowadzenie

Badania nad syntezą i właściwościami połączeń jonów metali ze związkami organicznymi doprowadziły do otrzymania ogromnej liczby nowych połączeń koordynacyjnych, ustalenia wpływu jonu centralnego na reaktywność ligandów organicznych oraz pozwoliły odtworzyć wiele procesów zachodzących *in vivo* [1, 2, 3] za pomocą stosunkowo prostych układów modelowych. Spośród szerokiej gamy ligandów grupę budzącą szczególne zainteresowanie stanowią związki o znaczeniu biologicznym, biorące udział w procesach metabolicznych, zarówno organizmów roślinnych, jak i zwierzęcych.

W ostatniej dekadzie XX w. wzrosło zainteresowanie badaniami dotyczącymi połączeń Cr(III). Wiele opracowań monograficznych poszerzyło wiedzę na temat metabolizmu tego jonu w aspekcie biochemicznym i toksykologicznym [4], jak również, choć w znacznie mniejszym stopniu, bionieorganicznym [5]. Chrom(III) jest ważnym biopierwiastkiem, którego niedobór powoduje zaburzenia tolerancji glukozy. Między innymi ustalono, że składnik zawierający jon Cr(III) wpływa dodatnio na działanie insuliny i nazwano go czynnikiem tolerancji glukozy GTF [6]. Wiadomo już, że w jego skład wchodzi organiczny kompleks chromu(III) z kwasem nikotynowym (wiązanym przez azot) oraz glutationem (Gly, Cys i Glu). Budowa i struktura GTF nie została jeszcze ostatecznie określona. Przypuszcza się, że Cr(III) może tworzyć potrójny kompleks z insuliną i receptorem insuliny w tkankach, ułatwiając w ten sposób ich wzajemne relacje [7].

Badania oddziaływań jonu Cr(III) z substancjami wchodzącymi w skład komórki miały na celu przede wszystkim poznanie struktury elektronowej i molekularnej oraz, w jego rezultacie mechanizmu działania GTF. Wielostronne badania modelowe, z zastosowaniem reagentów o znacznie prostszej budowie, pozwalają wyjaśnić mechanizm działania poszczególnych etapów metabolicznych wtedy, gdy rzeczywisty proces biologiczny jest zbyt skomplikowany. Układ złożony z jonu metalu i związku biologicznie czynnego może niekiedy stanowić model enzymu i posłużyć do wyjaśnienia reakcji enzymatycznej.

Badania nad układami modelowymi zawierającymi układ metal – biologicznie czynny ligand organiczny, mogą dostarczyć odpowiedzi na pytanie w jakim stopniu wiązanie z bioliganDEM modyfikuje reaktywność chemiczną badanych układów w odniesieniu do ich funkcji biologicznych.

Niemal wszystkie reakcje zachodzące w układach biologicznych są katalizowane przez białka zwane enzymami. CO₂ powstaje na drodze wielu procesów metabolicznych. Jednym z

kluczowych enzymów dostarczających CO₂ w mitochondriach komórek eukariotycznych jest dehydrogenaza pirogronianowa (PDH) [11]. Enzym ten katalizuje proces dekarboksylacji oksydacyjnej pirogronianu do octanu, “aktywowanego” w trakcie reakcji enzymatycznej połączeniem z CoA (koenzym A) do acetylo-CoA (acetylo-koenzym A). Aktywność kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej jest regulowana przez odwracalną fosforylację [12]. W stanach niedoboru energii (niski poziom ATP), pirogronian może ulegać dalszym przemianom katabolicznym do acetylo-CoA, redukcji do mleczanu lub, gdy poziom ATP jest wysoki, może stanowić substrat do syntezy cukrów, aminokwasów i kwasów tłuszczowych.

Ostatnie badania wskazują, że pirogronian, w warunkach niedokrwienia tkanek mięśnia sercowego działa jak “zmiatacz” wolnych rodników (scavenger), powstających na skutek stresu oksydacyjnego, generującego powstawanie pewnych ilości H₂O₂ [13]. Przypuszczalnie kwas pirogronowy ulega alternatywnej przemianie do CO₂ i octanu, na drodze reakcji z H₂O₂, mającej w warunkach jej przebiegu znaczenie cytoprotekcyjne [14-16].

Jedną z metod badania wychwytu CO₂ jest przekształcanie “obojętnej” cząsteczki w formę węglanowego związku koordynacyjnego. Badania nad wprowadzeniem do wewnętrznej sfery koordynacyjnej cząsteczki CO₂ doprowadziły do otrzymania i scharakteryzowania węglanowych układów koordynacyjnych głównie Co(III) i Cr(III). Chemia chromu(III) jest uboższa w tego typu połączenia [17-20]. Szczególnie trudne do otrzymania są związki koordynacyjne Cr(III) z pojedynczymi biologicznie czynnymi ligandami organicznymi i jonem CO₃²⁻. Łatwiej natomiast otrzymuje się związki zawierające w wewnętrznej sferze koordynacyjnej oprócz anionu CO₃²⁻ inne ligandy z donorowymi atomami tlenu, np. H₂O czy C₂O₄²⁻.

2. Połączenia Cr(III) jako związki biologicznie czynne

Jak dotąd jednoznacznie roli połączeń Cr(III) występujących w układach biologicznych. Jest to spowodowane głównie specyficznym charakterem (np. wielorakość stopni utlenienia) centrum koordynacji jakim jest jon chromu(III). W ostatnim czasie pojawiło wiele opracowań monograficznych dotyczących metabolizmu tego jonu w aspektach biochemicznym, toksykologicznym i (choć w mniejszym stopniu) bionieorganicznym [5]. Do badań kinetycznych nad procesami zachodzącymi w układach biologicznych niezbędne są związki stabilne, które ulegają wolnym przemianom. Warunki te spełniają w pełni związki chromu(III).

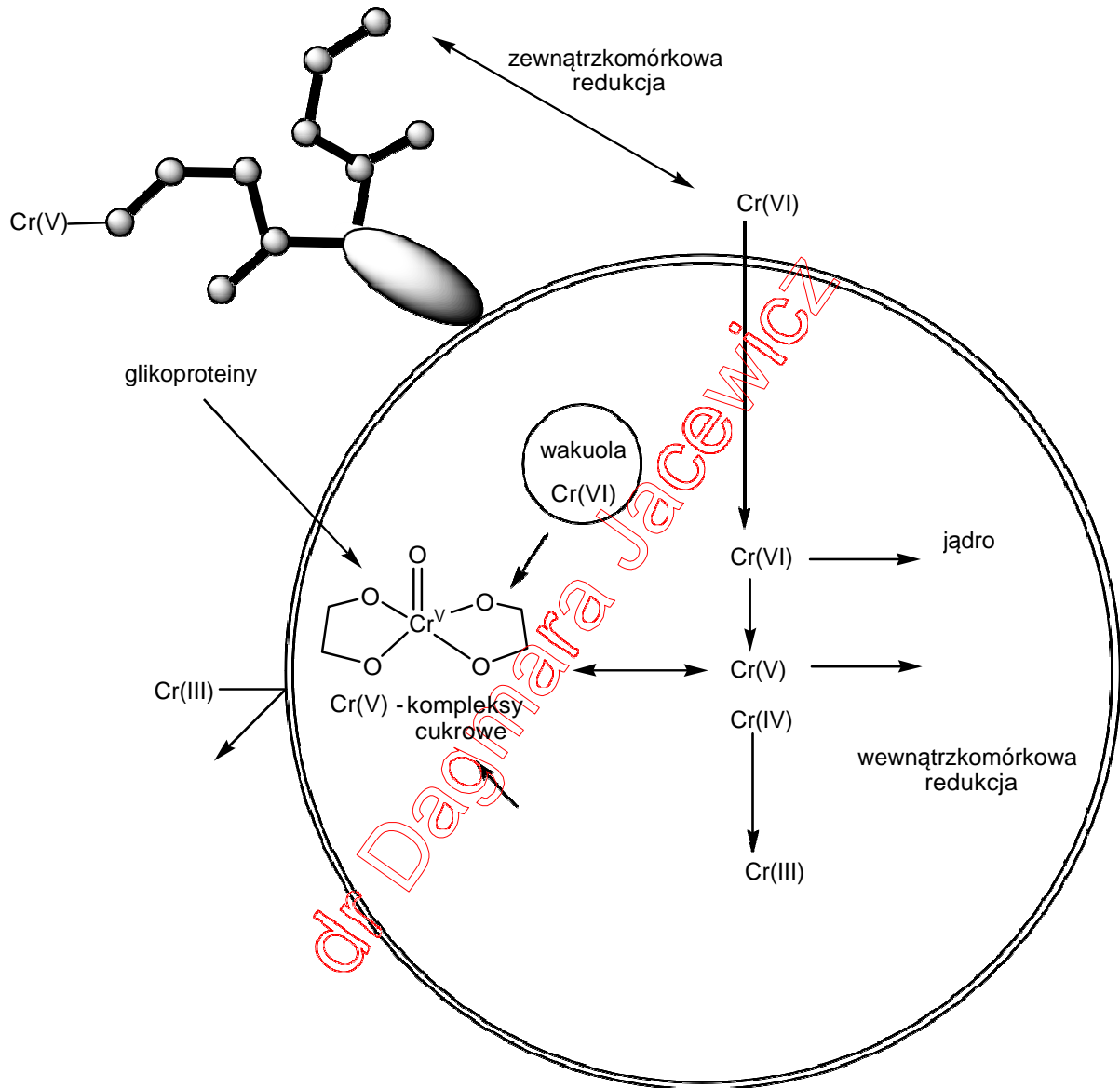
Badania dotyczące reakcji substytucji anionów koordynacyjnych $[\text{Cr}(\text{C}_2\text{O}_4)_2(\text{histamina})]^-$ oraz $[\text{Cr}(\text{C}_2\text{O}_4)_2(\text{witamina B}_6)]^-$ w roztworach wodnych przeprowadzone przez Kita [21, 22] wykazały, że wymienione połączenia Cr(III) stanowią quasi-enzymatyczne modele biologiczne. Oznacza to, że dzięki ich właściwościom możliwe jest poznanie i wyjaśnienie niektórych mechanizmów procesów enzymatycznych zachodzących *in vivo*.

Pionierskie prace Mertza et al. [23, 24] zwróciły uwagę na związki chromu(III) w podwyższeniu tolerancji glukozy, dowodząc m. in., że składnik zawierający jon Cr^{3+} (nazwano go czynnikiem tolerancji glukozy GTF (Glukose Tolerance Factor)) wpływa dodatnio na produkcję insuliny. W jego skład wchodzi organiczny kompleks chromu(III) z kwasem nikotynowym (niacyna) i glutationem, co omówione zostało w poprzednich rozdziałach. Ze względu na fakt, że budowa GTF nie została jeszcze poznana, przypuszcza się jedynie możliwe jego formy. Jedną z nich może być potrójny kompleks Cr(III) z insuliną i receptorem insuliny w tkankach, ułatwiający w ten sposób ich wzajemne relacje. Początkowo (1957) twierdzono, że GTF jest substancją, która jest wymagana do utrzymywania normalnego poziomu glukozy, która zapobiega i leczy nadmierne usuwanie glukozy (w przypadku stosowania diety niskocukrowej), czego wynikiem jest zmniejszenie dośylnej tolerancji glukozy [25]. Późniejsze badania wykazały, że GTF jest w organizmie postacią aktywną, a każdy wprowadzany związek chromu(III) jest do niej przekształcany [26]. Koncentraty posiadające aktywność GTF uzyskano z drożdży, wątroby i siary wołowej. Jak dotąd, nie udało się skryzalizować zawartej w nich substancji czynnej. Wiadomo jednak, że GTF wywiera korzystny wpływ na układ glukoza/insulina u osób z hipoglikemią, hiperglikemią, cukrzycą typu 2 i hiperlipidemią. Nie potwierdzono jednak jego działania na układ glukoza/insulina u osób zdrowych. Podsumowując związki Cr(III) odgrywają ważną rolę w kontroli układu glukoza/insulina.

3. Oddziaływanie chromu(III) ze składnikami komórek

Głównym źródłem chromu(III) dla człowieka jest żywność (warzywa, mięso), powietrze miejskie, dym papierosowy [27, 28]. Niektóre sole Cr(III) (Np. polinikotynian czy chlorek) są używane jako suplementy dietetyczne, a ich spożywanie jest świadomym wprowadzaniem tego jonu do organizmu drogą pokarmową. Mają one pozytywny wpływ na zdrowie człowieka, co potwierdzono licznymi badaniami klinicznymi [29].

Cr(III) jest słabo absorbowany przez komórki organiczne, podczas gdy Cr(VI) absorbowany jest bardzo chętnie. Z tego względu w organizmie mamy do czynienia głównie z chromem(VI), który po absorpcji (lecz przed dostaniem się do krwioobiegu) ulega przekształceniu do chromu(III) (Rys. 1).



Rys. 1. Występowanie chromu na róŜnych stopniach utlenienia w organizmie

Chrom(III) jest niezdolny do przedostania się do wnętrza większości komórek prawdopodobnie dlatego, Œe spora część jego związków występująca w organizmach jest

nierozpuszczalna w wodzie [30-32]. Z kolei Cr(VI) przenika przez błonę komórkową dzięki transporterom anionowym [33-35]. Wewnątrz komórek eukariota Cr(VI) jest redukowany metabolicznie, za pomocą glutationu czy cysteiny, do Cr(III) [36]. Chrom(VI) nie reaguje z makromolekułami, takimi jak DNA, RNA, białka czy lipidy, zawartymi w komórkach. Cr(III) z kolei jest zdolny do koordynacji z wymienionymi związkami wielkocząsteczkowymi [29]. Cr(III) produkowany wewnątrz komórek w wyniku redukcji chromianów(VI), jest wiązany głównie w kompleksy organiczne, zawierające NAD^+ , kwasy nukleinowe i inne składniki komórkowe. W przypadku bakterii *Escherichia coli*, opisanej przez Foncave'a et al. [37], reduktazy flawinowe z flawinami gwałtownie redukują chromiany do rozpuszczalnego i stabilnego kompleksu Cr(III)- NAD^+ , który z kolei wytwarza Cr(III) w formie trudno rozpuszczalnych związków, zwykle $\text{Cr}(\text{OH})_3$ lub Cr_2O_3 [38].

Zbadano mechanizm tworzenia *in vitro* kompleksu aminokwas-Cr(III)-DNA oraz jego specyficzność [39]. Kiedy DNA związał Cr(III), a następnie reagował z histydyną lub cysteiną, nie otrzymywano Źądanego kompleksu. Dopiero po utworzeniu kompleksu histydyny lub cysteiny chromu(III) i następnie reakcji z DNA uzyskano oczekiwany potrójny związek koordynacyjny. Rezultaty otrzymane podczas badań wskazały jednoznacznie na to, Źe to grupa fosforanowa jest zasadniczym miejscem wiązania kompleksu Cr(III)-aminokwas przez DNA, co miało istotne znaczenie w wyjaŹnianiu w jaki sposób chrom(III) wiąŹe się z tym kwasem nukleinowym w organizmach Źywych.

Kolejno badano juŹ trwałe kompleksy kationowe chromu(III) oddziałujące elektrostatycznie z ujemnie naładowanymi grupami fosforanowymi DNA [40]. Stwierdzono, Źe sole Cr(III), takie jak CrCl_3 czy $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$, wiąŹą silnie DNA w obojętnym Źrodowisku wodnym i koordynują z grupą fosforanową oraz z atomem N-7 guaniny. Generowany biologicznie Cr(III) włączony w DNA moŹe powodować powstanie połączeń takich jak DNA-DNA, DNA-peptyd lub DNA-aminokwas co zademonstrowano w badaniach nad komórkami eukariota [41]. Takie zachowanie wskazuje, Źe jon chromu na trzecim stopniu utlenienia jest rakotwórczą formą tego pierwiastka. Kortenkamp et al. [42] argumentował, Źe reakcje silnie kwasowego kompleksu, takiego jak CrCl_3 , z izolowanym DNA są mało prawdopodobne i nie mogą być związane z oddziaływaniami Cr-DNA *in vivo* oraz sugerował, Źe wewnątrzkomórkowa redukcja Cr(VI) blisko DNA moŹe prowadzić do utworzenia kompleksu reduktor-Cr(III)-DNA. Oprócz właściwości genotoksycznych, kompleks Cr(III)-DNA powoduje: zwiększenie wydajności syntezy RNA, zmiany w funkcji endonukleazy, zahamowanie replikacji DNA przez polimerazę. Dodatkowo cząsteczka kompleksu Cr(III) wykazuje właściwości katalizujące fosforylację białek i oddziałuje z komórkami błony.

Chrom wywiera również ogromne implikacje na układ odpornościowy. Z tego względu prowadzono szereg badań, które miały na celu opisanie wpływu tego pierwiastka przejściowego na układ specjalizujący się w zwalczaniu zakażeń i niszczeniu komórek nowotworowych [43].

Cr(III) może łączyć się z proteinami tworząc w układzie immunologicznym kompletny antygen, który zidentyfikowano wpuszczając w obieg antyciała przeciw Cr(III), ale nie przeciw Cr(VI) [44]. Borella et al. [45] dowiódł w badaniach *in vitro*, że wpływ jonów metali toksycznych, wliczając w nie Cr(III) i Cr(VI), na fitohemoaglutyninę (inicjatora mitozy w hodowli normalnych ludzkich leukocytów) wywołuje blastogenezę (transformację małych limfocytów do większych komórek, które mają zdolność ulegania mitozie) w ludzkich limfocytach.

Obecność chromu(III) w organizmie ludzkim ma swoje pozytywne strony. Do funkcji chromu(III) w organizmie zalicza się: pobudzanie aktywności komórek beta trzustki, dzięki czemu produkowana jest insulina; zwiększanie ilości receptorów tego hormonu oraz zwiększanie aktywności receptora insuliny – kinazy, co powoduje wzrost wrażliwości na insulinę. Ponadto chrom zwiększa magazynowanie glukozy w mięśniach wspomagając syntezę glikogenu. Pierwiastek ten stymuluje przemiany energetyczne i syntezę kwasów tłuszczowych, pobudza transport aminokwasów do komórek. Dzięki ograniczeniu odkładania tłuszczu, Cr(III) przeciwdziała chorobie cywilizacyjnej - otyłości. Korzystne fizjologiczne skutki suplementacji chromu objawiają się również w przypadku niektórych chorób, między innymi miażdżycy. Chrom, przez regulację poziomu lipidów we krwi oraz wpływanie na utrzymywanie równowagi pomiędzy poziomem cholesterolu LDL i HDL, zapobiega powstawaniu tego schorzenia [46].

Głównymi drogami usuwania z organizmu nieprzyswojonego chromu są nerki/uryna i śluz/kał [27-28].

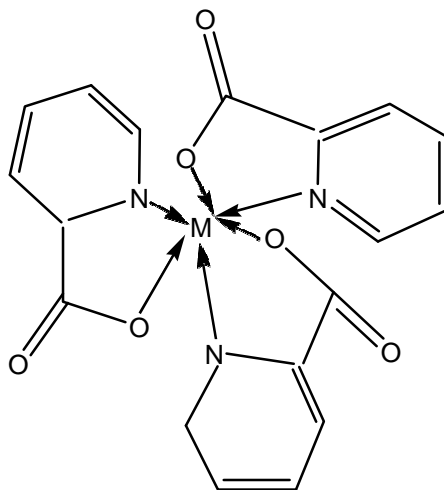
4. Mutageność związków chromu(III)

Chrom istnieje w naturze głównie w dwóch formach: chrom sześciowartościowy [chrom(VI)] i chrom trójwartościowy [chrom(III)]. Związki chromu(VI) są około 1000-krotnie bardziej cytotoksyczne i mutagenne w ludzkich fibroblastach niż związki chromu trójwartościowego [47]. W badaniach klinicznych, w których stosowano ilości nie przekraczające 1 mg chromu na dobę, nie stwierdzono żadnych właściwości toksycznych tego śladowego pierwiastka [48]. Badania na roślinach wykazały jednak, że obecność Cr(III)

powoduje poważne uszkodzenia tkanek żywych, chociaż musi on występować w dużym stężeniu w porównaniu z Cr(VI) [49].

Pojawienie się w organizmie jonów chromu(III) może być następstwem biologicznej redukcji Cr(VI), co jest jednym ze sposobów usuwania chromu na szóstym stopniu utlenienia, ponieważ to proces redukcji ($\text{Cr}^{6+} + 3 \text{e}^- \rightarrow \text{Cr}^{3+}$) jest mutageny [50]. Ponadto wykazano szkodliwe działanie Cr(III) na system immunologiczny. Chrom(III) oddziałuje na różne komponenty systemu odpornościowego, co w konsekwencji może prowadzić do immunopobudzenia lub immunohamowania. Skutkiem redukcji Cr(VI) do Cr(III) w systemie odpornościowym jest powstawanie reaktywnych produktów pośrednich, które w połączeniu ze stresem oksydacyjnym, uszkodzeniami tkanek (rezultat utleniania) i kaskadą zderzeń komórkowych, przyczyniają się do cytotoksyczności, genotoksyczności i rakotwórczości [51].

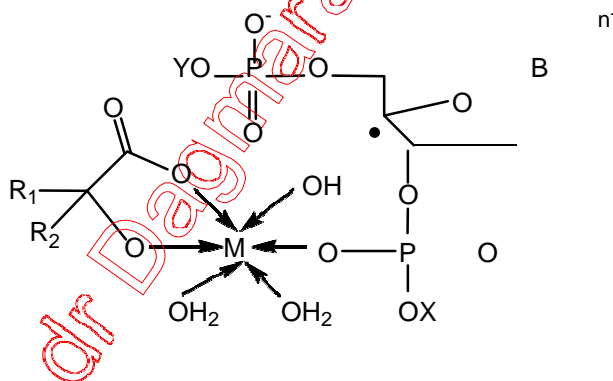
Badania porównawcze, dotyczące dwóch popularnych suplementów dietetycznych, pikolinianu chromu(III) (Rys. 2) i niacyny związanej z chromem(III), ukazały różne charakterystyki tych związków. W toku doświadczeń wykazano, że pikolinian chromu(III) powoduje znacząco duży stres oksydacyjny i uszkadza DNA. Duże dawki pikolinianu chromu(III) wywołują zmiany będące wynikiem mutagennych właściwości tej substancji, między innymi powstawanie pęcherzy skórnych, hemolizę, anemię, obrzęki tkanek, dysfunkcje wątroby, uszkodzenia komórek neuronowych, anormalność chromosomalną; wzmacnia on również produkcję rodników hydroksylowych oraz zubaża organizm w enzymy antyutleniające. Zastosowanie identycznej dawki chlorku chromu(III) nie wywołuje natomiast żadnych zmian, ale jest on za to gorzej przyswajalny przez organizm. Z kolei niacyna związana z chromem(III) okazała się być substancją bardziej dostępną biologicznie i skuteczniejszą w porównaniu z pikolinianem chromu(III), a jej toksyczności nie potwierdzono.



Rys. 2. Struktura związku koordynacyjnego chromu(III) z kwasem pikolinowym

Kompleksy Cr(III) z ligandami nieorganicznymi (np. z chlorkami) nie są toksyczne dla człowieka. Jednak kompleksy chromu(III) zawierające w sferze koordynacyjnej aromatyczne iminy jako ligandy, $cis-[Cr(phen)_2Cl_2]^+$, $cis-[Cr(bpy)_2Cl_2]^+$ i $[Cr(bpy)_2(C_2O_4)]^+$ są mutagenne dla bakterii *Salmonella typhimurium* [52]. Mutagenność bakteryjna 1,10-fenantroliny zawartej w podanym jonie kompleksowym nie może być przypisywana bezpośrednio ligandowi (wolna phen nie jest czynnikiem mutagennym dla *Salmonella typhimurium* [53]), przy czym istnieje przekonanie, że lipofilowa natura ligandów: phen i bpy wzmacnia przenikalność kompleksu, przyczyniając się do toksyczności danego kompleksu [40]. W przypadku glonów *Euglena gracilis*, zaobserwowano, że Cr(III) powoduje zmniejszenie tempa wzrostu danej hodowli [54].

Wewnątrz komórek chrom trójwartościowy może powstać na skutek redukcji chromianów(VI) (Rys. 2), zachodzącej przy udziale witamin C i B₁₂, cytochromu P-450 lub w czasie przemian mitochondrialnego łańcucha oddechowego [32]. Tak wytworzony chrom(III) może zostać wbudowany za pomocą grup fosforanowych w DNA (Rys. 3), oddziałując jednocześnie na replikację i transkrypcję RNA czy wywołując mutagenzę.



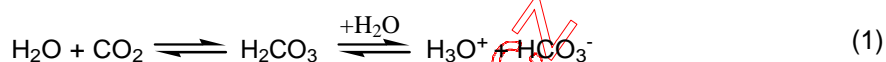
Rys. 3. Fragment struktury DNA koordynujący za pomocą atomu tlenu grupy fosforanowej jon chromu(III)

Uszkodzenia DNA spowodowane utlenieniem mogą być rozpatrywane na podstawie efektów toksycznych wywołanych przez chrom(III) [55]. Cr(III) może reagować z grupami karboksylowymi lub tiolowymi enzymów powodując zmiany w ich strukturze oraz aktywności [31]. Modyfikacja aktywności polimerazy DNA oraz innych enzymów może być również spowodowana zastąpieniem jonów magnezu przez jony Cr³⁺ [56].

To czy chrom(III) jest jonem mutagennym, zależy w głównej mierze od jego stężenia i/lub rodzaju otaczających go ligandów [57], jeżeli stanowi on centrum koordynacji. Tezę tę potwierdzają przeprowadzone badania kliniczne [58].

5. Równowaga i trwałość CO₂ w roztworze

Tlenek węgla(IV) jest substancją mało aktywną pod względem chemicznym. Tlenek węgla(IV) jest bezwodnikiem kwasu węglowego obecnego w małym stężeniu w roztworach wodnych tego gazu, dzięki czemu roztwory te uzyskują odczyn słabo kwasowy. Prezentuje to reakcja:



Kwas węglowy jest kwasem dwuprotonowym, przy czym jego pierwsza stała dysocjacji, K_{a1} , obliczana jest zazwyczaj z uwzględnieniem całkowitego stężenia CO₂ w roztworze:

$$K_{a1} = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+][\text{HCO}_3^-]}{[\text{CO}_2] + [\text{H}_2\text{CO}_3]} = 4,45 \cdot 10^{-7} \quad (2)$$

natomiast drugą stałą kwasowości K_{a2} wynosi odpowiednio:

$$K_{a2} = \frac{[\text{CO}_3^{2-}][\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{HCO}_3^-]} = 4,8 \cdot 10^{-11} \quad (3)$$

Ze względu na trudności związane z dokładnym określeniem stężenia kwasu węglowego, szacuje się, że wartość rzeczywista stałej dysocjacji K'_{a1} obliczonej z poniższego równania wynosi:

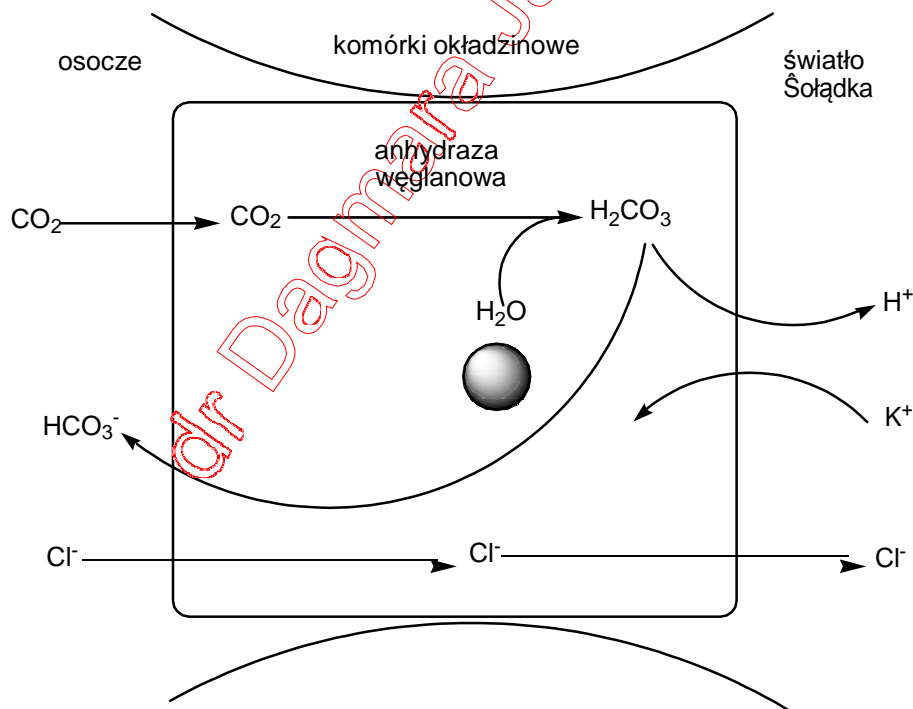
$$K'_{a1} = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+][\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]} = 2,5 \cdot 10^{-4} \quad (4)$$

W przypadku roztworów o pH niższym niż 3 (niższym niż $\text{p}K_{a1}$) równowaga reakcji (1) przesunięta jest w stronę lewą, czyli preferowane jest powstawanie tlenku węgla(IV). W układzie takim będą obecne nie jony HCO_3^- a CO_2 . Jest to jeden ze sposobów uzyskiwania roztworów tego gazu. Węglany są znacznie trwalsze od samego kwasu. Pod działaniem kwasów wszystkie węglany wydzielają tlenek węgla(IV).

6. Obecność CO₂ w układach biologicznych

Stwierdzenie, że tlenek węgla(IV) jest składnikiem chemicznym każdego organizmu żywego nikogo nie dziwi. Całkowita ilość CO₂ znajdującego się w organizmie w osoczu i surowicy wynosi 24-29 mmol/l. Obecność CO₂ w układach biologicznych odgrywa znaczącą rolę w przebiegu wielu procesów, czego dowodem może być znaczna ilość prac nad różnymi aspektami dotyczącymi tego gazu, prezentowanymi pokrótce w dalszej części tego rozdziału.

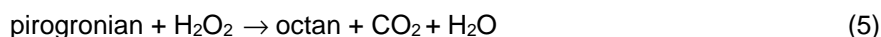
Przykładem uczestniczenia CO₂ w procesach zachodzących w organizmie człowieka może być wytwarzanie kwasu solnego w żołądku. Prezentuje to Schemat 1. Kwas węglowy powstający z CO₂, osocza i H₂O, w wyniku działania anhidrazy węglanowej, jest donorem jonów H⁺. Po oddysocjowaniu protonu, HCO₃⁻, zostają wydalone z organizmu razem z moczem, o czym świadczy jego zasadowy charakter. Wytworzone w ten sposób jony H⁺ przedostają się do światła żołądka, gdzie łączą się z jonami chlorkowymi (wydzielanie Cl⁻ sprzężone jest z wydzielaniem H⁺).



Schemat 1. Pośredni udział CO₂ w produkcji kwasu solnego w żołądku

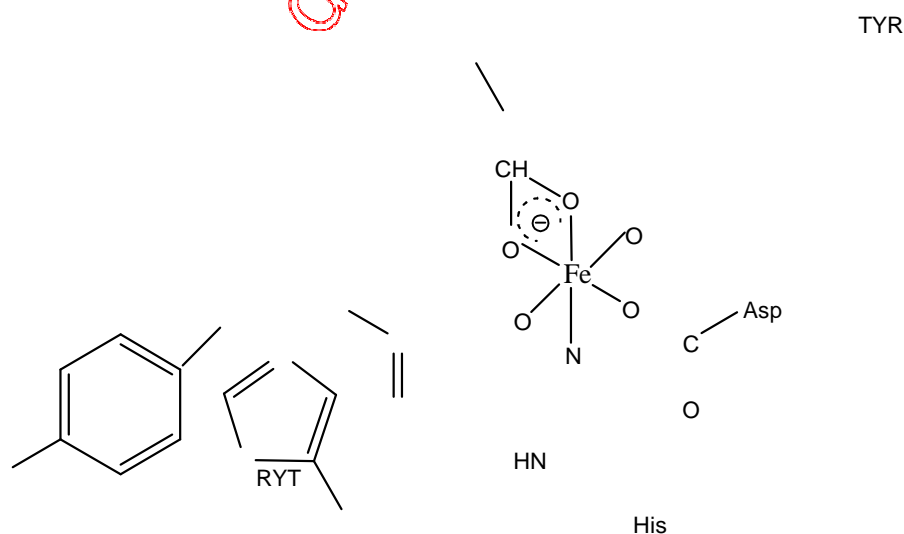
Liczność enzymów z klasy dekarboksylaz, odpowiedzialnych za wydzielanie CO₂ z poszczególnych związków potwierdza, że tlenek węgla(IV) ma swoje endogenne źródła w organizmie. Kolejnymi przykładami mogą być dekarboksylazy: adenozyłometioninowa, L-

glutaminianowa, histydynowa, α -ketokwasowa, ornitynowa czy pirogronianowa. Ostatni z wymienionych enzymów uruchamia także procesy transportu elektronów w łańcuchu oddechowym mitochondriów, na skutek redukcji cząsteczek tlenu do cząsteczki wody. W wyniku zaburzenia tego procesu dochodzi do powstawania cząsteczek H_2O_2 , które w nieenzymatycznej reakcji z pirogronianem ulegają alternatywnej przemianie do CO_2 i octanu zgodnie ze schematem:



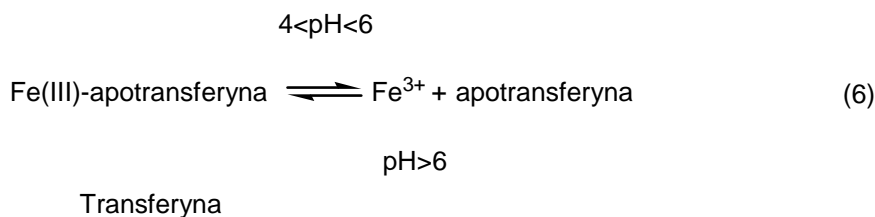
Jednak mechanizm antyutleniającego działania pirogronianu w tym procesie nie jest do końca poznany, za sprawą tlenu uwalnianego w postaci wolnych rodników. Najnowsze badania wskazują, że pirogronian, w warunkach niedokrwienia tkanek mięśnia sercowego działa jak “zmiatacz” (scavenger) wolnych rodników powstających na skutek stresu oksydacyjnego, generującego powstawanie pewnych ilości H_2O_2 [59]. Przepuszczalnie kwas pirogronowy ulega alternatywnej przemianie do CO_2 i octanu, na drodze reakcji z H_2O_2 , mającej w warunkach jej przebiegu znaczenie cytoprotekcyjne [14-16].

Istotną rolą biologiczną tlenku węgla(IV) w organizmach ludzkich jest jego udział w tworzeniu związków koordynacyjnych, czego przykładem może być transferyna (Rys. 4). Pod względem chemicznym jest to związek kompleksowy, którego centrum koordynacji stanowi $Fe(III)$. Z punktu widzenia biologicznego jest to białko. Cząsteczka transferyny składa się z dwóch podjednostek, z czego każda w specjalnej wnęce ma jeden jon Fe^{3+} . Jon CO_3^{2-} lub HCO_3^- działa synergicznie w wiązaniu $Fe(III)$ z apotransferyną (białkiem nie posiadającym jonu tego metalu przejściowego). Zadaniem transferyny jest doprowadzenie jonu żelaza(III) do miejsc, w których biosyntezowane są cząsteczki i w których niezbędna jest obecność $Fe(III)$.



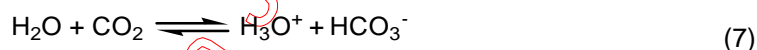
Rys. 4. Budowa transferyny

Kompleks Fe-apotransferyna w odpowiednim pH rozkłada się na poszczególne składniki, co prezentuje reakcja:

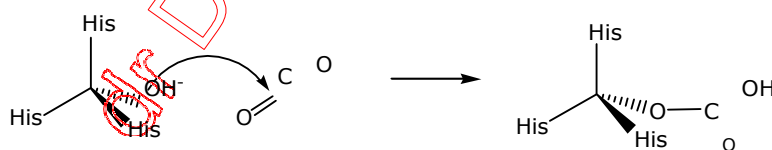


Reakcją konkurencyjną do wymienionej wyżej jest reakcja protonowania reszty wodorowęglanowej i wydzielanie CO_2 i H_2O .

Wielka aktywność katalityczna enzymów wynika z ich zdolności do wiązania cząsteczek substratów w ściśle określonym ułożeniu i stabilizacji stanów przejściowych w procesie tworzenia i zrywania wiązań chemicznych. Przy braku enzymów większość reakcji w układach biologicznych zachodzi tak wolno, że są one prawie niezauważalne. Nawet tak mało skomplikowana reakcja, jaką jest hydratacja CO_2 , jest katalizowana enzymatycznie przez anhydrazę węglanową:



To katalityczne przyspieszenie jest częściowo spowodowane działaniem obecnego w tym enzymie jonu cynkowego, który jest skoordynowany z resztami histydyny. Woda wiązana z jonem Zn(II) ulega natychmiastowemu przekształceniu w jon wodorotlenowy (Schemat 2), usytuowany precyzyjnie do ataku na znajdującą się obok cząsteczkę CO_2 .

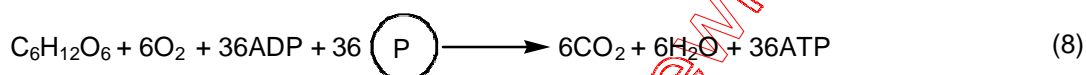


Schemat 2. Nukleofilowy atak enzymu cynkowego na elektrofilową cząsteczkę dwutlenku węgla

Jon cynku pomaga zarówno w odpowiednim zorientowaniu cząsteczki CO_2 , jak i w wytworzeniu lokalnie dużego stężenia jonów OH^- . Anhydraza węglanowa jest silnym katalizatorem, ponieważ umożliwia bliski kontakt substratów i ich optymalne ułożenie dla reakcji. Liczne badania mechanizmu wiązania CO_2 w aktywne miejsca enzymu dowiodły, że tlenek węgla(IV) nie jest bezpośrednio związany z jonem Zn(II) [60]. Dodatkowo udowodniono, że aby uzyskać katalityczną aktywność, obok trzech reszt histydyny, jon metalu musi być bezpośrednio skoordynowany z cząsteczką wody [61]. Badania dotyczące

wpływu pH środowiska na aktywność anhidrazy węglanowej dały interesujące rezultaty. Stwierdzono, że podstawowa forma enzymu jest aktywna w procesie wiązania CO₂, podczas gdy forma kwasowa aktywuje proces dehydratacji HCO₃⁻ [61]. Zaproponowano dwa modele kinetyczne wyjaśniające chemiczną naturę enzymu i wpływ na jego aktywność takich czynników jak pH środowiska, sposób koordynacji jonu centralnego przez ligandy oraz obecność grupy hydroksylowej (zamiennie cząsteczki wody) jako liganda.

Tlenek węgla(IV) ma swoje źródło endogenne w organizmie żywym, czego przykładem może być reakcja kataboliczna - oddychanie (utlenienie biologiczne). Oddychanie wewnątrzkomórkowe to proces polegający na rozkładzie związków złożonych, np. glukozy na substancje proste, np. H₂O i CO₂. W wyniku tego procesu powstaje energia, która jest wykorzystywana następnie do przebiegu wielu funkcji życiowych organizmu. Proces ten jest przedstawiany za pomocą następującego równania reakcji:



Oddychanie wewnątrzkomórkowe jest procesem wielostopniowym, katalizowanym przez enzymy. Jego celem jest wyzwolenie energii i zmagazynowanie jej w postaci ATP. Bardziej szczegółowo zostanie to przedyskutowane w kolejnym podrozdziale.

Dowiedziano, że glukoza znajdująca się w tkance tłuszczowej może wchodzić w wiele szlaków metabolicznych, łącznie z utlenianiem do CO₂ poprzez cykl kwasu cytrynowego. Gdy zużycie glukozy jest duże, wówczas większa część pobranej glukozy jest utleniana (prowadząc do wytworzenia tlenu węgla(IV)) i przetwarzana w kwasy tłuszczowe [62].

7. Metody przepływowe

Po raz pierwszy zostały one zastosowane przez Reschinga [63]. Badał on szybkość reakcji pomiędzy tlenkiem azotu(IV) i tlenem, gdzie czas przemiany zmieniał się od 0,025 do 25 sekund. Kolejnymi naukowcami, którzy w 1923 roku rozwinęli tę technikę byli Hardrige i Roughton [64]. Zastosowali oni ją do badania szybkości reakcji dla procesów biologicznych w roztworach wodnych. Opracowali oni metodę, dzięki której możliwe było badanie reakcji, gdzie czas połowicznej przemiany mieścił się w przedziale od 0,001 do 10 sekund. Zaletą metod przepływowych i jednocześnie podstawą tych metod jest szybkie zmieszanie reagentów w odpowiedniej komorze a zarazem ciągły pomiar substratów lub/i produktów. Generalnie metody przepływowe stosuje się w celu śledzenia reakcji, których czas połowicznej przemiany zawiera się w przedziale od 10⁻³ do 10² sekund.

Jedną z najbardziej popularnych odmian metod przepływowych zasługujących na szczególną uwagę, jest **metoda zatrzymanego przepływu** (*stopped-flow*), którą jako pierwszy zastosował Chance [64]. Technikę stopped-flow stosuje się głównie do badań reakcji w roztworach [65]. Jest ona wykorzystywana w znacznym stopniu do rozwiązywania dużej liczby problemów kinetyki chemicznej, badania szybkości przejść konformacyjnych w kwasach nukleinowych i w białkach oraz identyfikacji kompleksów przejściowych [63]. Do mniej popularnych odmian metod przepływowych zaliczyć można [66] **metodę ciągłego przepływu** (*continuous flow*) - metoda ta jest pewną drogą osiągnięcia szybkiego mieszania i pozwala monitorować reakcję w dowolnym czasie, innym niż czas rzeczywisty. Mieszanie może być zakończone w przeciągu 1 ms, tak więc przy użyciu tej metody faktycznie można badać reakcję o czasie połowicznej przemiany rzędu 10^{-3} s. Typowa prędkość przepływu to 10 m/s, więc długość 1 cm odpowiadać będzie 1 ms danej reakcji. Technikę **przerwanego przepływu** (*quenched flow*) stosuje się przeważnie dla roztworów. Tak jak w przypadku dwóch pozostałych metod przepływowych, przy użyciu metody quenched flow można badać reakcję o czasie połowicznej przemiany rzędu 10^{-3} s. Jest ona najmniej rozpowszechnioną metodą przepływową.

8. Spektrofotometryczna technika stopped-flow w badaniach kinetyki reakcji chemicznych

Technika stopped-flow jest jedną z najbardziej popularnych metod przepływowych. Jako metodę analityczną najczęściej wykorzystuje się spektrofotometrię, ale możliwe są także inne metody np. konduktometria czy fluorescencja.

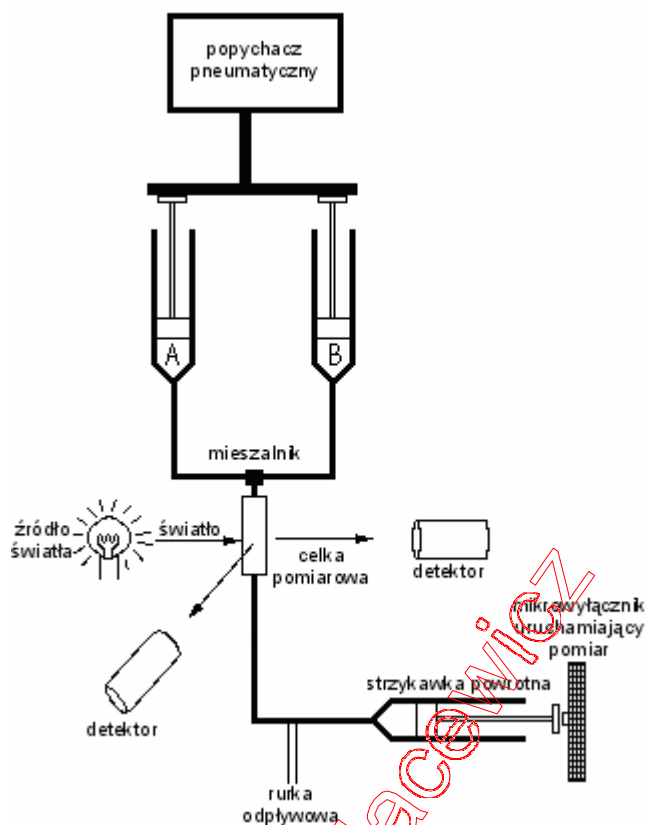
Na Rys. 5 przedstawiono zestaw pomiarowy SX 18MV-R firmy Applied Photophysics, stosowany w badaniach kinetyki reakcji metodą stopped-flow. Typowy układ pomiarowy składa się z systemu monitorującego, układu mieszającego, monochromatora, detektor, lampy deuterowej i termostatu.



Rys. 5. Zestaw aparatury SX.18MV-R firmy Applied Photophysics, stosowanej w metodzie stopped-flow

Na Rys. 6 przedstawiono schemat blokowy urządzenia [65]. Roztwory reagentów umieszcza się oddzielnie w dwóch strzykawkach roboczych A i B, a następnie przepycha się przewodami przez mieszalnik (mieszanie zachodzi bardzo szybko – 10^{-3} s), i kolejno przez celkę pomiarową aż do strzykawki powrotnej. Wypełnienie strzykawki powrotnej roztworem powoduje wypchnięcie tłoka uderzającego w mikrowyłącznik. W tym momencie następuje zatrzymanie przepływu i początek pomiaru. Postęp reakcji w porcji roztworu zatrzymanego w celce pomiarowej kontrolowany jest zazwyczaj spektrofotometrycznie.

Podczas pomiaru mierzona jest zmiana stężenia substratu lub/i produktu w funkcji czasu. Mieszaninę poreakcyjną ze strzykawki powrotnej usuwa się do naczynia na zlewki poprzez rurkę odpływową.



Rys. 6. Schemat aparatury uŹywanej w metodzie stopped-flow, firmy Applied Photophysics

ZAKRES I CEL ĆWICZENIA

Główny cele ćwiczenia to:

- Synteza i charakterystyka spektroskopowa połączenia koordynacyjnego chromu(III) *cis*- $[\text{Cr}(\text{C}_2\text{O}_4)_2(\text{OH}_2)_2]^-$
- Wykorzystanie cząsteczki CO_2 jako indywidualium modelowego cząsteczki gazowej do wyznaczenia stałych szybkości etapów reakcji oraz zaproponowanie mechanizmu reakcji karboksylacji za pomocą techniki stopped – flow (*modelowe badania chemiczne*);

Ad. a.

Chrom na trzecim stopniu utlenienia jako centrum koordynacji tworzy kompleksy inertne, ulegające stosunkowo wolnym przemianom w temperaturze pokojowej (godzinna skala czasowa). Dzięki tej właściwości możliwe jest prowadzenie szczegółowych badań nad kinetyką i mechanizmem procesów chemicznych.

Ad. b.

Jednym z kryterium wyboru cząsteczki CO₂ jako substratu w reakcjach wychwytu jest jego dostępność. Otrzymywanie CO₂ w laboratorium jest procesem niezwykle prostym. Do tego celu najczęściej stosuje się roztwór węglanu sodu, który zakwaszony roztworem HCl do pH = 3 generuje tlenek węgla(IV). Ten z kolei, jako bezwodnik kwasowy, ulega w roztworze wodnym reakcjom równowagowym określonym przez wartości K_{a1} i K_{a2}. Mieszaniny anionu wodorowęglanowego i węglanowego (HCO₃⁻/CO₃²⁻) czy anionu wodorowęglanowego i kwasu węglowego (HCO₃⁻/H₂CO₃) stanowią roztwory buforowe, które zapewniają utrzymywanie w odpowiednim zakresie stałego pH, a w aspekcie biologicznym ten ostatni jest buforem fizjologicznym. Stosowanie CO₂ jako modelowego chemicznego indywiduum powoduje, że uzyskane wyniki można odnieść do modelowych badań biologicznych i kolejno klinicznych.

Reakcje wychwytu i uwalniania CO₂ zachodzą niezmiennie w procesach biologicznych i są katalizowane przez enzymy, zawierające w swojej strukturze jon metalu. Odpowiednia konfiguracja centrum katalitycznego, rodzaj przykoordynowanego liganda a także środowisko, w którym zachodzą te przemiany ma ogromny wpływ na wzrost aktywności katalitycznej oraz selektywność i specyficzność działającego enzymu. Zasadnym zatem wydają się badania kinetyczne polegające na otrzymaniu takiego połączenia koordynacyjnego, które w prosty sposób będzie wiązało cząsteczkę gazowego CO₂. Określenie sposobu koordynacji nowego liganda, określenie etapów tego procesu oraz wyznaczenie wartości stałych szybkości reakcji pozwoli na uzyskanie bazy modelowych układów, które w zależności od pH i stężenia mogą zostać wykorzystane w sposób selektywny i specyficzny w odniesieniu do układów biologicznych. Otrzymany w ten sposób odpowiedni chemiczny model kinetyczny, może pomóc w zrozumieniu specyfiki oddziaływania tego indywiduum ze składnikami komórki oraz poznania i określenia miejsc aktywnych enzymu, biorących bezpośredni udział w tworzeniu i rozrywaniu wiązań.

CZEŚĆ LABORATORYJNA

Otrzymywanie *trans*-K[Cr(C₂O₄)₂(OH₂)₂] × 3H₂O

4,0 g K₂Cr₂O₇ rozpuścić w 8 cm³ wrzącej wody, następnie otrzymany roztwór dodawać małymi porcjami, ciągle mieszając do 12 g H₂C₂O₄ · 2H₂O w 17 cm³ wrzącej wody umieszczonego uprzednio w zlewce na 400 cm³. Zlewkę należy przykryć szkiełkiem zegarkowym i pozostawić do krystalizacji w zaciemnionym miejscu. Po 4 dniach wytrącone

kryształy odsączyć i przemyć na zmianę lodowatą wodą i etanolem. Otrzymany produkt suszyć na powietrzu. Syntezę przeprowadzić sześciokrotnie. Następnie zarejestrować widmo elektronowe w zakresie widzialnym 350-700 nm w celu identyfikacji otrzymanego produktu. Obliczyć wydajność [67].

Otrzymywanie *cis*-K[Cr(C₂O₄)₂(OH₂)₂] × 3H₂O

2,0 g K₂Cr₂O₇ i 6 g H₂C₂O₄ · 2H₂O rozetrzeć w osobnych moździerzach. Następnie wymieszać oba substraty w parownicy i umieścić ją na płycie kuchenki elektrycznej. Ogrzewać mieszaninę, dodać 3-4 krople wody (po ściance parownicy). Po około 5 minutach dodać 20 ml etanolu i rozcierać zawartość tłuczkiem aż do momentu zestalenia się. W momencie gdy zestalenie nie następuje, zdekantować etanol, dodać nową porcję 20 ml etanolu i procedurę powtórzyć. Produkt odsączyć i przemyć na zmianę małymi porcjami etanolu i eteru. Produkt suszyć na powietrzu. Syntezę przeprowadzić trójrotnie. Następnie zarejestrować widmo elektronowe w zakresie widzialnym 350-700 nm w celu identyfikacji otrzymanego produktu. Obliczyć wydajność [67].

Badanie czystości

Kilka otrzymanych kryształów potraktować 5-6 kroplami rozcieńczonego roztworu amoniaku. W przypadku izomeru „trans” powinien powstać jasnobrązowy osad, natomiast w przypadku izomeru „cis” – powstaje zielony roztwór [67].

Oznaczanie składu *cis*-K[Cr(C₂O₄)₂(OH₂)₂] × 3H₂O

Skład badanych połączeń koordynacyjnych ustalić na podstawie stosunku molowego chromu(III) do anionu szczawianowego [67].

Oznaczanie chromu(III)

Przygotować 3 nawałki soli kompleksowej (0,05; 0,06; 0,07 g), następnie rozpuścić w kolbie miarowej na 100 ml. Kolejno odpipetować 5 ml tego roztworu do kolby miarowej na 100 ml, dodać 10 ml 1 M NaOH, 10 ml wody i 1 ml 30 % H₂O₂. Ogrzewać na łaźni wodnej (90⁰C) przez 30 minut aż do momentu całkowitego rozkładu H₂O₂. Otrzymany klarowny roztwór ochłodzić i uzupełnić wodą do kreski. Następnie zmierzyć absorbancję roztworu przy $l = 372$ nm. Jako odnośnik zastosować 0,1 M NaOH. W obliczeniach uwzględnić wartość molowego współczynnika absorbancji, który wynosi $4,82 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [67].

Oznaczanie anionu szczawianowego

Przygotować 3 nawałki soli kompleksowej (0,2; 0,21; 0,22 g), następnie rozpuścić w 20 ml wody (zlewka na 100 ml), dodać 5 ml 1 M NaOH, umieścić na łaźni wodnej i ogrzewać przez 30 minut aż do całkowitego rozkładu kompleksu. Kolejno dodać około 3 ml roztworu 1 M H₂SO₄ do momentu zobojętnienia lub słabo kwaśnego odczynu, a następnie stęśonego

roztworu amoniaku do całkowitego wytrącenia osadu. Osad odsączyć i przemyć gorącą wodą zbierając przesącz do kolby stoiskowej. Kolejno przesącz zakwasić 25 ml 2,5 M H_2SO_4 , ogrzać do około 60°C i miareczkować 0,02 M mianowanym roztworem KMnO_4 [67].

Widma w zakresie widzialnym

Odważyć 0,040 g *cis*- $\text{K}[\text{Cr}(\text{C}_2\text{O}_4)_2(\text{OH})_2] \times 3\text{H}_2\text{O}$ i 0,15 g *trans*- $\text{K}[\text{Cr}(\text{C}_2\text{O}_4)_2(\text{OH})_2] \times 3\text{H}_2\text{O}$ a następnie kolejno rozpuścić w 10 ml 0,001 M HNO_3 . Otrzymane roztwory przesączyć i zarejestrować widma w zakresie widzialnym [67].

Przygotowanie roztworów do badania reakcji wychwytu CO_2

Przygotowanie roztworów buforowych

Przygotować 0,2 M roztwory buforowe Tris [Tris-(hydroksometylo)-aminometan] o wartościach pH podanych przez prowadzącego ćwiczenie

Przygotowanie roztworu CO_2

W celu przygotowania roztworu CO_2 w pierwszej kolejności należy sporządzić 1 M roztwór NaClO_4 poprzez rozpuszczenie 21,07g tej soli w 150 cm^3 wody destylowanej. 0,01 M Na_2CO_3 należy przygotować rozpuszczając 0,4292g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ w 150 cm^3 1 M roztworu NaClO_4 . Przed każdą serią pomiarów kinetycznych 15 cm^3 tak przygotowanego roztworu zakwasić 1M kwasem solnym do $\text{pH} \approx 3,4$. Zakwaszenie spowoduje rozkład CO_3^{2-} z wydzielaniem CO_2 , który pozostawał rozpuszczony w roztworze.

Przygotowanie roztworów związków koordynacyjnych

Roztwory związków koordynacyjnych przygotować bezpośrednio przed przystąpieniem do pomiarów kinetycznych. Sporządzić je przez dodanie do $0,2\text{ cm}^3$ bazowego roztworu związku koordynacyjnego o określonym stężeniu, 5 cm^3 0,2 M TRIS i 5 cm^3 2 M NaClO_4 .

W celu określenia pH roztworu reakcyjnego, pobierać 2 cm^3 tak przygotowanego roztworu i następnie mieszać z taką samą ilością zakwaszonego do $\text{pH} \approx 3,4$ roztworu Na_2CO_3 , po czym zmierzyć pH.

Technika pomiaru szybkości reakcji metodą zatrzymanego przepływu

W celu przeprowadzenia pomiarów kinetycznych zostanie wykorzystana technika zatrzymanego przepływu (*stopped-flow*). Do tego celu należy zastosować mikroobjętościowy zestaw do badań metodą zatrzymanego przepływu – *stopped-flow* SX.18MV-R1, który znajduje się na wyposażeniu Wydziału Chemii UG.

Badania dotyczące wychwytu CO_2 przez badany związek koordynacyjny prowadzone będą w 3-4 różnych temperaturach oraz przy stężeniu $\text{CO}_2 = 0,01\text{ M}$. W tym celu w jednej ze strzykawek rezerwarowych należy umieścić roztwór CO_2 o odpowiednim stężeniu,

natomiast w drugiej – roztwór badanego kompleksu + 2 M NaClO₄ + bufor (0,2 M bufor Tris) o określonym pH. Roztwory z tych strzykawk naleŝy przepchnąć do strzykawek roboczych o pojemności 2 cm³. Następnie przez mieszalnik i celkę pomiarową do strzykawki powrotnej zostaną przepchnięte po około 0,3 cm³ z obydwu strzykawk. Przebieg reakcji będzie kontrolowany spektrofotometrycznie w zakresie 340 – 700 nm. Po zakończonym pomiarze mieszanina poreakcyjna zostanie usunięta do naczynia na zlewki ze strzykawki powrotnej przez rurkę odpływową.

Literatura

- [1] P. Henchrey, A. M. Sargeson, *Aust. J. Chem.*, **39**, 1177, 1986.
- [2] M. I. Clark, H. Taube, *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 5413, 1974.
- [3] K. D. Danenberg, W. W. Cleland, *Biochem.*, **14**, 28, 1975.
- [4] M. Cieślak-Golonka, *Wiadomości Chem.*, **45**, 403, 1991.
- [5] J. Barrett, P. O'Brien, J. Pedrosa de Jesus, *Polyhedron*, **4**, 1, 1985.
- [6] D. H. Brown, W. E. Smith, M. S. El-Shahawi, M. F. K. Wazir, *Inorg. Chem. Acta*, **124**, 1-25, 1986.
- [7] W. Mertz, K. Schwarz, *Am. J. Physiol.*, **196**, 614, 1959.
- [11] T. M. Devli, *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*, Wiley – Liss Inc., New York, 249, 1992.
- [12] B. Huang, R. Gudi, P. Wu, R. A. Harris, J. Hamilton, K. M. Poper, *J. Biol. Chem.*, **273**, 17680, 1998.
- [13] J. A. Crestanello, D. M. Lingle, J. Millili, G. J. Whitman, *Surgery*, **124**(1), 92, 1998.
- [14] L. Cavallini, M. Valente, M. P. Rigobello, *J. Mol. Cell Cardiol.*, **22**, 143, 1990.
- [15] R. Bunker, B. Swindall, D. Brodie, *J. Mol. Cell Cardiol.*, **18**, 423, 1986.
- [16] R. M. Mentzer, D. G. L. Van Wylen, J. Shodi, *Ann. Surg.*, **209**, 629, 1989.
- [17] K. Mesbah, E. Kita, P. Kita, *Polish J. Chem.*, **65**, 1597, 1991.
- [18] M. Eshel, A. Bino, *Inorg. Chim. Acta*, **20**, 45, 2002.
- [19] J. Threeprom, S. Purachaka, L. Potipan, *J. Chromatogr. A*, **6**, 291, 2005.
- [20] M. Eshel, A. Bino, *Inorg. Chim. Acta*, **13**, 127, 2001.
- [21] E. Kita, *Polish J. Chem.*, **65**, 1909, 1991.
- [22] E. Kita, *Polish J. Chem.*, **65**, 1933, 1991.
- [23] W. Mertz, K. Schwartz, *Am. J. Physiol.*, **196**, 614, 1959.
- [24] W. Mertz, K. Schwartz, *Arch. Biochem. Biophys.*, **58**, 504, 1955.
- [25] K. Schwatz, W. Metrz, *Arch. Biochem. Biophys.*, **72**, 515, 1957.
- [26] W. Mertz, "Forty years of chromium researches", USDA Beltsville Human Nutrition Research Center, Dedham, 1998.
- [27] R. F. Hertel, *IARC Sci. Publ.*, **71**, 63, 1986.
- [28] US Environmental Protection Agency, "Health effects assessment for hexavalent chromium. Prepared by the Office of Health and Environmental Assessment, Environmental Criteria", EPA/540/ 1-86-019 Cincinnati, updated 1998.
- [29] R. A. Anderson, *Diabetes Metab.*, **26**, 22, 2000.
- [30] E. E. Carry, (Langard, S., Ed.), *Elsevier*, Amsterdam, 48, 1982.
- [31] A. G. Levis, V. Bianchi, (Langard, S., Ed.), *Elsevier*, Amsterdam, 171, 1982.
- [32] J. Alcedo, K. E. Wetterhahn, *Int. Rev. Exp. Path.*, **31**, 85, 1990.
- [33] J. Dreyfuss, *J. Biol. Chem.*, **239**, 2292, 1964.
- [34] H. J. Wiegand, H. Ottenweilder, H. M. Bolt, *Arch. Toxicol.*, **57**, 31, 1985.
- [35] J. Alexander, J. Aashet, *Analyst*, **120**, 931, 1995.
- [36] P. H. Connet, K. E. Watterhahn, *Struct. Bonding*, **54**, 93, 1983.
- [37] M. Fontcave, R. Eliasson, P. Reichard, *J. Biol. Chem.*, **262**, 12325, 1987.
- [38] J. Barnhart, J. Soil, *Contam.*, **6**, 561, 1997.
- [39] A. Zhitkovish, V. Voitkun, M. Costa, *Biochemistry*, **35**, 7275, 1996.

- [40] R. T. Watson, N. Desai, J. Wildsmith, J. F. Wheeler, N. A. P. Kane-Maguire, *Inorg. Chem.*, **38**, 2683, 1999.
- [41] A. Flores, J. M. Perez, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **161**, 75, 1999.
- [42] A. Kortenkamp, B. Curran, P. O'Brien, *Carcinogenesis*, **13**, 307, 1992.
- [43] P. P. Gatta, K. D. Thompson, R. Smullen, A. Piva, S. Test, A. Adams, *Fish Shellfish Immunol.*, **11**, 371, 2001.
- [44] D. P. Bruynzeel, G. Hennipman, W. G. Van Ketel, *Contact Dermatitis*, **19**, 175, 1988.
- [45] P. Borella, S. Manni, A. Giardino, *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.*, **4**, 87, 1990.
- [46] N. Cheng, "Chromium- The Chinese Experience", Tang-An Corporation, Pekin, China, Dedham, 1998.
- [47] K. A. Biederman, J. R. Landolph, *Cancer. Res.*, **50**, 7835, 1990.
- [48] R. A. Anderson, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **26(1)**, 35, 1997.
- [49] P. R. Skeffington, P. R. Shewry, P. J. Peterson, *Planta*, **132**, 209, 1976.
- [50] H. Ohtake, S. Silver, (*Chaundhry, G. R., Ed.*), 403, Dioscorides, Portland, OR., 1994.
- [51] R. Shrivastava, R. K. Upreti, P. K. Seth, U. C. Chaturvedi, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **34**, 1, 2002.
- [52] G. Warren, P. Schultz, D. Bancroft, K. Bennet, E. H. Abbot, S. Rogers, *Mutat. Res.*, **90**, 111, 1981.
- [53] T. Hashimoto, T. Negishi, T. Namba, S. Hayakawa, H. Hayatsu, *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 1954, 1979.
- [54] E. Brochiero, J. Bonaly, J. C. Mestre, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **13**, 630, 1984.
- [55] J. Aiyar, H. J. Berkovits, R. A. Floyd, K. E. Wetternhahn, *Environ. Health Perspect.*, **92**, 53, 1991.
- [56] E. T. Snow, *Environ. Health Perspect.*, **3**, 41, 1994.
- [57] D. Bagchi, E. A. Hassoun, M. Bagchi, D. Muldoon, S. Stohs, *J. Comp. Biochem. Physiol.*, **110C**, 281, 1995.
- [58] S. J. Stohs, D. Bagchi, *J. Free Radic. Biol. Med.*, **18**, 321, 1995.
- [59] E. Bassenge, O. Sommer, M. Schwemmer, R. Büniger, *Am. J. Physiol Heart Circ Physiol.*, **279**, H2432, 2000.
- [60] R. G. Khalifah, *J. Biol. Chem.*, **246**, 2561, 1971.
- [61] Y. Pocker, T. L. Deits, N. Tanaka, *Adv. Solution Chem.. Int. Symp, ' Solute-Solute-Solvent Interact. 5th*, **1980**, 253, 1981.
- [62] D. B. Jump, *J. Lipid Res.*, **35**, 1076, 1994.
- [63] T. D. Steward, K. R. Edmund, *J. Am. Chem. Soc.*, **48**, 1014, 1923.
- [64] H. S. Johnston, *Disc. Faraday Soc.*, **17**, 14, 1954.
- [65] J. Keeler, "Kinetics of Chemical Reactions", University of Cambridge, Department of Chemistry, 25, IA Chemistry 2002/03.
- [66] Wilkins, "Kinetics and Mechanism of Reactions of Transition Metal Complexes", VCH Weinheim, New York, Basel, Cambridge 1991.
- [67] J. Chatłas, A. Katafias, P. Kita, G. Wrzeszcz, „Ćwiczenia laboratoryjne z chemii nieorganicznej”; Toruń 1995.

Dr Dagnata Jacewicz