

# TIAZYNOWE I TIAZOLYDYNOWE POCHODNE AMINOKWASÓW SIARKOWYCH I WYBRANYCH ENDOGENNYCH ALDEHYDÓW

## THIAZINE AND THIAZOLIDINE DERIVATIVES OF SULFUR-CONTAINING AMINO ACIDS AND SELECTED ENDOGENIC ALDEHYDES

**Marta Gawel<sup>1,2\*</sup>, Justyna Piechocka<sup>1</sup>,  
Rafał Głowacki<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Katedra Chemii Środowiska, Wydział Chemii, Uniwersytet Łódzki*

<sup>2</sup>*Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych, Uniwersytet Łódzki*

\**e-mail: marta.gawel@edu.uni.lodz.pl*

---

### Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Charakterystyka przedmiotu badań

1.1. Aminokwasy tiolowe - cysteina i homocysteina

1.2. Wybrane endogenne aldehydy

1.3. Reaktywność aldehydów względem cysteiny i homocysteiny

1.4. Aminokwasy tiolowe i wybrane aldehydy w stanach (pato)fizjologicznych w organizmie człowieka

2. Oznaczanie wybranych tiazolidynowych pochodnych

2.1. Tiazolidynowa pochodna cysteiny i formaldehydu

2.2. Tiazolidynowa pochodna cysteiny i acetaldehydu

2.3. Tiazolidynowa pochodna cysteiny i fosforanu 5'-pirydoksalu

3. Metody oznaczania wybranych tiazynowych pochodnych

3.1. Tiazynowa pochodna homocysteiny i formaldehydu

3.2. Tiazynowa pochodna homocysteiny i acetaldehydu

3.3. Tiazynowa pochodna homocysteiny i fosforanu 5'-pirydoksalu

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane

---

**Mgr Marta Gawel** jest studentką drugiego roku w Szkole Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Łódzkiego. W 2022 roku uzyskała tytuł magistra w zakresie chemii na podstawie przedstawionej pracy „Optymalizacja procedury przygotowania próbek owoców jagodowych do oznaczania całkowitej zawartości wybranych aminokwasów tiolowych techniką LC-DAD”, którą przygotowała pod kierunkiem prof. dra hab. Rafała Głowackiego. Obecnie prowadzi badania dotyczące opracowywania metod umożliwiających oznaczanie związków biologicznie ważnych w różnych matrycach biologicznych z wykorzystaniem techniki chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas. Badania realizuje w Katedrze Chemii Środowiska Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego pod opieką prof. dra hab. Rafała Głowackiego oraz dr Justyny Piechockiej.



<https://orcid.org/0009-0006-2241-6877>

**Dr Justyna Piechocka** jest zatrudniona na stanowisku adiunkta w Katedrze Chemii Środowiska na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego. Rozprawę doktorską zatytułowaną „Wysokosprawna chromatografia cieczowa wybranych pochodnych endogennych tioli” obroniła w 2018 roku. Jej zainteresowania naukowe koncentrują się na opracowywaniu metod analizy próbek biologicznych (mocz, ślina, osocze) na zawartość istotnych z biologicznego punktu widzenia endo- i egzogennych związków siarki. Metody te, opierają się na wykorzystaniu technik separacji w fazie ciekłej i gazowej. Dodatkowy aspekt badawczy stanowi poszukiwanie związków, które mogłyby pełnić rolę nowych markerów wybranych chorób cywilizacyjnych, w szczególności nieznanymi metabolitów homocysteiny i spokrewnionych z nią w szlaku przemian metabolicznych związków siarki.



<https://orcid.org/0000-0002-1160-3160>

**Prof. dr hab. Rafał Głowacki** jest pracownikiem Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego. Od roku 2011 kieruje Katedrą Chemii Środowiska, w której realizowane są interdyscyplinarne badania z pogranicza chemii analitycznej, biochemii oraz medycyny. Jego zainteresowania naukowe dotyczą rozwoju nowoczesnych metod analitycznych, bazujących na różnych odmianach technik separacyjnych i ich aplikacji do próbek biologicznych, m.in. osocza krwi, moczu, śliny, tkanek stałych, a także próbek środowiskowych. W obszarze badań biomedycznych specjalizuje się w analityce związków siarki, spośród których szczególne miejsce zajmuje tiolakton homocysteiny i produkty jego przemian metabolicznych. Główne techniki badawcze stanowią wysokosprawna chromatografia cieczowa oraz chromatografia gazowa, sprzężone z różnymi trybami detekcji, w tym z detekcją mas, a także wysokosprawna elektroforeza kapilarna. Profesor Rafał Głowacki jest autorem/współautorem ponad 120 publikacji, w tym 107 notowanych w bazie JCR.



<https://orcid.org/0000-0003-0071-1470>

---

**ABSTRACT**

Sulfur-containing amino acids, including cysteine (Cys) and homocysteine (Hcy), as well as aldehydes such as formaldehyde (FA), acetaldehyde (AA), pyridoxal 5'-phosphate (PLP), acrolein (ACR), malondialdehyde (MDA), croton aldehyde (CA) and 4-hydroxynonenal (4-HNE) widely occur in the human body. As indicated in the literature, abnormal (elevated) concentrations of these compounds in humans may result in or even be the cause of the occurrence/development of some civilization diseases. At the same time, the literature provides the evidence that Cys and Hcy are highly reactive towards aldehydes resulting in formation of substituted thiazolidine and thiazine carboxylic acids, respectively. Importantly, it has been shown that these adducts are formed in vitro and in vivo, while chromatographic techniques are suitable for their monitoring in biological samples. In this work, the above-mentioned issues are discussed. In particular, Cys and Hcy as well as selected endogenous aldehydes are characterized, and their role in human body in health and disease is discussed. Moreover, chromatographic methods enabling determination of selected adducts of Cys and Hcy with the above-mentioned aldehydes in biological samples are described.

Keywords: homocysteine, cysteine, 1,3-thiazolidine-4-carboxylic acids, 1,3-thiazine-4-carboxylic acids, chromatography

Słowa kluczowe: homocysteina, cysteina, kwasy 1,3-tiazolidyno-4-karboksyłowe, kwasy 1,3-tiazyno-4-karboksyłowe, chromatografia

---

---

**WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW**

AA	– aldehyd octowy
ACN	– acetonitryl
ACR	– akroleina
CA	– aldehyd krotonowy
- COOH	– grupa karboksylowa
Cys	– cysteina
GC-MS	– chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas
Glu	– glutation
FA	– aldehyd mrówkowy
Hcy	– homocysteina
Hcy-PLP	– kwas 2-pirydoksylo-1,4-tiazyno-4-karboksylowy
homo-MTCA	– kwas 2-metylo-tetrahydro-1,3-tiazyno-4-karboksylowy
homo-TCA	– kwas 1,3-tiazyno-4-karboksylowy
HPLC-UV	– wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona z detektorem spektrofotometrycznym
HPPTCA	– kwas 2-(3-hydroksy-5-fosfonooksymetylo-2-metylo-4-pirydylo)-1,3-tiazolidyno-4-karboksylowy
LC-MS/MS	– chromatografia cieczowa sprzężona z tandemowym spektrometrem mas
MDA	– dialdehyd malonowy
Met	– metionina
MTCA	– kwas 2-metylo-1,3-tiazolidyno-4-karboksylowy
-NH <sub>2</sub>	– grupa aminowa
PLP	– fosforan 5'-pirydoksalu
-SH	– grupa sulfhydrylowa
TCA	– kwas 1,3-tiazolidyno-4-karboksylowy
4-HNE	– 4-hydroksynonenal

## WPROWADZENIE

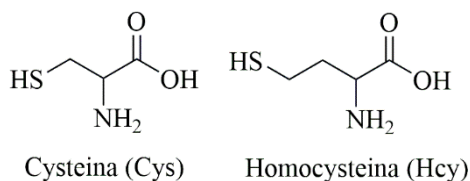
W organizmie człowieka zachodzi szereg skomplikowanych przemian metabolicznych, w wyniku których powstają rozmaite związki chemiczne, odpowiedzialne często za jego prawidłowe funkcjonowanie. Niekiedy jednak dochodzi do zachwiania fizjologicznej równowagi, wskutek czego następuje rozwój różnego rodzaju patologii. Zaburzenia w prawidłowym funkcjonowaniu organizmu przyczyniają się do wygenerowania szeregu schorzeń zaliczanych do chorób cywilizacyjnych, których geneza z roku na rok zdaje się być coraz lepiej poznana. Do wspomnianych patologii można zaliczyć np. choroby neurodegeneracyjne, takie jak choroba Parkinsona i choroba Alzheimera, choroby układu krążenia czy choroby nowotworowe. Niewątpliwie ważnymi z biologicznego punktu widzenia związkami, które występują w organizmie człowieka są aminokwasy siarkowe, do których zalicza się m.in. homocysteinę (Hcy) i cysteinę (Cys). Inną istotną grupę stanowią aldehydy. Wykazano, że w wielu przypadkach związki te są w stanie ze sobą reagować, a produktami tych reakcji są tiazynowe oraz tiazolidynowe pochodne. Z racji ich potencjalnej roli w prawidłowym funkcjonowaniu organizmu człowieka zasadnym jest ich badanie, w tym opracowywanie metod oznaczania w płynach biologicznych. Niniejsze opracowanie jest poświęcone pochodnym Hcy oraz Cys z formaldehydem (FA), aldehydem octowym (AA), fosforanem 5'-pirydoksalu (PLP), akroleiną (ACR), dialdehydem malonowym (MDA), aldehydem krotonowym (CA) oraz 4-hydroksynonenalem (4-HNE).

### 1. Charakterystyka przedmiotu badań

#### 1.1. Aminokwasy tiolowe – cysteina i homocysteina

Małocząsteczkowe związki siarki, takie jak Cys, Hcy (Rysunek 1) czy glutation (Glu) należą do szerokiej i różnorodnej grupy związków – przeciwutleniaczy. Ich charakterystyczną cechą strukturalną jest posiadanie trzech grup funkcyjnych, tj. grupy aminowej (-NH<sub>2</sub>), karboksylowej (-COOH) i sulfhydrylowej (-SH). Jedną z ich ról jest natomiast ochrona organizmu przed negatywnymi skutkami działania stresu oksydacyjnego. Szczególną rolę w tym obszarze odgrywa Glu. W warunkach fizjologicznych aminotiole pełnią szereg innych ważnych funkcji, a zakłócenia w ich metabolizmie wiązane są z rozwojem szeregu tzw. chorób cywilizacyjnych, do których należą choroby układu krążenia, choroby neurodegeneracyjne czy nowotwory. Cys oraz Hcy powstają w wyniku przemian metabolicznych metioniny (Met), aminokwasu dostarczanego do organizmu wraz z pokarmem. W pierwszym etapie wspomnianych przemian Met ulega demetylacji, w wyniku której powstaje Hcy. Ta z kolei ulega reakcji transsulfuracji, która prowadzi do powstania Cys.

Źródłem Cys w organizmie człowieka jest przede wszystkim pełnowartościowa żywność, między innymi mięso, ryby, jaja, orzechy, nasiona oraz warzywa i owoce. W przypadku niedoboru może być dostarczana do organizmu w postaci suplementów diety [1]. W przeciwieństwie do Cys, Hcy nie występuje w produktach spożywczych, więc powstaje ona jedynie w wyniku przemian Met. Zarówno Cys jak i Hcy posiadają w swojej strukturze niezwykle reaktywną grupę -SH, której obecność w dużo większym stopniu niż grupy -COOH i -NH<sub>2</sub> determinuje właściwości fizykochemiczne. Tym samym określa rolę jaką pełnią one w organizmach żywych.



Rysunek 1.      Poglądowe struktury chemiczne cysteiny i homocysteiny  
 Figure 1.      Chemical structures of cysteine and homocysteine

### 1.2. Wybrane endogenne aldehydy

Aldehydy są to związki chemiczne dość powszechnie występujące w środowisku. Ekspozycja organizmu człowieka na czynniki środowiskowe przyczynia się zatem do ich wchłaniania, głównie poprzez drogi oddechowe [2]. Na obszarach uprzemysłowionych aldehydy powstają w większości w wyniku spalania ropy naftowej i jej pochodnych. Dzieje się to bezpośrednio lub też poprzez przekształcanie węglowodorów w wyniku fotochemicznych reakcji utleniania [3]. Źródłem aldehydów w środowisku jest także dym papierosowy [3]. Co ciekawe wykazano, że źródłem szkodliwych aldehydów są także popularne w ostatnich latach tzw. e-papierosy, uważane za bezpieczniejszą alternatywę dla tradycyjnego palenia tytoniu. Endogenne aldehydy powstają również w organizmie człowieka na skutek przemian metabolicznych aminokwasów, węglowodanów, witamin, steroidów, amin biogennych czy procesów komórkowych, takich jak peroksydacja lipidów [4]. Jednym z głównych czynników przyczyniających się do powstawania w organizmie wysoce reaktywnych aldehydów jest stres oksydacyjny. Związki te reagują bezpośrednio z DNA, czego skutkiem jest doprowadzenie do jego uszkodzeń, co z kolei przyczynia się do rozwoju różnych stanów patofizjologicznych, takich jak nowotwory, stany zapalne czy choroby neurodegeneracyjne [4,5]. Grupa aldehydów występujących w organizmie człowieka jest dość liczna, a wśród nich możemy

wymienić MDA, ACR, CA, 4-HNE – stanowiące główne produkty peroksydacji lipidów, a także PLP, FA i AA (Rysunek 2).

Spośród endogennych aldehydów najprostszym pod względem budowy jest FA (metanal, formaldehyd). Powstaje on podczas metabolizmu wielu substancji, zarówno endo- jak i egzogennych, np. Met, seryny, glicyny, choliny oraz podczas demetylacji związków, które w swojej budowie posiadają grupy: *N*-, *O*- oraz *S*-metylowe. Jest związkiem, który ze względu na znaczną rozpuszczalność w wodzie łatwo wchłania się do organizmu poprzez drogi oddechowe lub przez skórę. Ponieważ jest on popularnym odczynnikiem używanym w wielu gałęziach przemysłu, jego obecność stanowi niepodważalnie o ryzyku zawodowym [6]. Stosowany jest powszechnie w produkcji klejów, barwników, farb oraz lakierów. Wykorzystywany jest także w przemyśle papierniczym, fotograficznym, garbarskim, rafineryjnym i w budownictwie [7]. FA zyskał popularność także w branży kosmetycznej, a jego 37% roztwór w wodzie (formalina) jest powszechnie stosowany do dezynfekcji oraz jako konserwant. Do organizmu może dostać się także w wyniku spożycia owoców, surowych warzyw, mięsa, ryb czy mleka [8]. FA w środowisku powstaje między innymi w wyniku utleniania metanu a także związków występujących naturalnie takich jak terpenoidy [3].

AA (etanal, acetaldehyd) powstaje w organizmie człowieka, a konkretnie jest on wytwarzany w wątrobie, głównie wskutek przemian metabolicznych spożytego alkoholu etylowego [9]. Podobnie jak FA może także zostać wprowadzony do organizmu drogą pokarmową [8]. Jego zwiększone stężenie w organizmie człowieka wiąże się z rozwojem szeregu powikłań związanych z nadmiernym spożywaniem alkoholu etylowego, takich jak rak przełyku, wątroby czy gardła [5]. Również wdychanie oparów acetaldehydu, których źródłem mogą być np. spaliny samochodowe, może wywołać skutki podobne do zatrucia alkoholem etylowym (ból głowy, nudności, wymioty).

PLP określane jest mianem aktywnej formy witaminy B<sub>6</sub>. W organizmie człowieka powstaje na skutek metabolizmu pirydoksyny pochodzenia roślinnego i zwierzęcego. Zwierzęta oraz człowiek wykorzystują także pirydoksynę syntezowaną w niewielkich ilościach przez bakterie jelitowe oraz dostarczaną do organizmu w postaci suplementów diety. Szczególnie bogate źródło witaminy B<sub>6</sub> stanowią mięso, warzywa oraz owoce [10].

ACR (propenal, akroleina) to aldehyd, który produkowany jest przez organizm człowieka podczas peroksydacji lipidów i na skutek metabolizmu wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Może także do niego trafić w wyniku

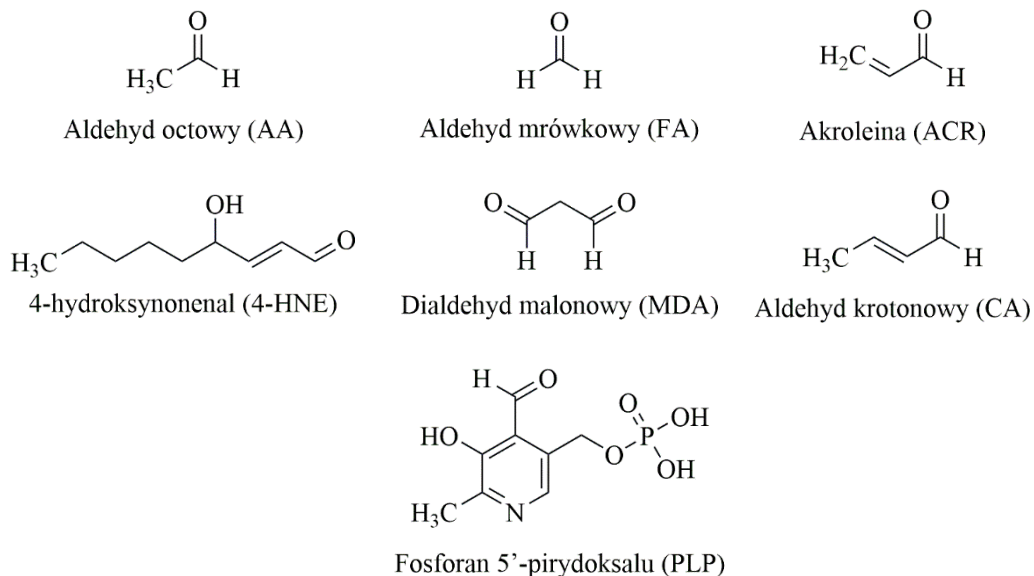
narażenia na czynniki zewnętrzne, takie jak wdychanie oparów kuchennych, dymu papierosowego czy spalin samochodowych. ACR powstaje również w wyniku biotransformacji cyklofosfaminu – powszechnie stosowanego leku przeciwnowotworowego [11]. Źródłem ACR jest także żywność [12]. Obecność ACR potwierdzono w warzywach, owocach oraz różnego rodzaju popularnych napojach, takich jak piwo, wino, kawa czy herbata [8]. Ponieważ jest ona najsilniejszym elektrofilem spośród wszystkich  $\alpha,\beta$ -nienasyconych aldehydów, do których zalicza się także 4-HNE i CA, wykazuje największą reaktywność w stosunku do nukleofilowej grupy tiolowej Cys [11].

4-HNE jest silnie reaktywną cząsteczką, stanowiącą jeden z głównych czynników przyczyniających się do powstawania stresu oksydacyjnego. Jedną z najważniejszych dróg prowadzących do jego usunięcia z komórek jest zawarta w szlaku metabolicznym reakcja z Glu [5].

MDA stanowi jeden z najważniejszych markerów stresu oksydacyjnego [5,13]. Wprowadzony może zostać do organizmu poprzez przewód pokarmowy, np. po spożyciu ryb, mięsa czy mleka, a jego szczególnie wysoką zawartość odnotowano w zjełczałej żywności [8]. Stanowi główny i najczęściej badany produkt peroksydacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Występuje w olejach, szczególnie roślinnych, lub żywności zawierającej te oleje.

CA pochodzi zarówno ze źródeł endogennych (peroksydacja lipidów) jak i egzogennych – wdychanie dymu papierosowego [5]. W środowisku głównym jego źródłem są spaliny samochodowe. Do atmosfery dostaje się także na skutek spalania drewna czy polimerów. Występuje także w niewielkich ilościach w warzywach, owocach, mleku, mięsie i rybach [8].





Rysunek 2. Poglądowe struktury chemiczne wybranych endogennych aldehydów  
 Figure 2. Chemical structures of selected endogenic aldehydes

### 1.3.Reaktywność aldehydów względem cysteiny i homocysteiny

W literaturze opisane są reakcje Hcy oraz Cys z aldehydami, prowadzące do powstawania odpowiednio kwasów 1,3-tiazyno-4-karboksyłowych oraz kwasów 1,3-tiazolidyno-4-karboksyłowych (Rysunek 3). Mechanizm ich tworzenia obejmuje przyłączenie grupy aminowej Cys lub Hcy do grupy karbonyłowej aldehydu. Pierwszym etapem jest utworzenie zasady Schiffa (iminy), stanowiącej produkt pośredni. W kolejnym kroku dochodzi do ataku nukleofilowego wysoce reaktywnej grupy -SH na wiązanie C=N w iminie. Ostatnim etapem reakcji jest kondensacja aminotiolu z odpowiednim aldehydem, w wyniku której powstaje pięcioczłonowy pierścień tiazolidynowy (w przypadku reakcji z Cys) lub sześcioczłonowy pierścień tiazynowy (w przypadku reakcji z Hcy) [14]. Reakcje te są proste, szybkie i zachodzą w środowisku wodnym. Zauważono, że otrzymane pochodne charakteryzuje różna trwałość, uzależniona od pH i rodzaju środowiska reakcji [15]. W literaturze można znaleźć informacje, iż wspomniane pochodne mogą powstawać zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo* [16,17]. Jak dotąd opisano zaledwie kilka metod umożliwiających oznaczanie tiazolidynowych czy tiazynowych pochodnych endogennych aminotiolu i aldehydów w próbkach biologicznych.

W literaturze istnieją doniesienia o występowaniu tiazolidynowej pochodnej, będącej produktem reakcji pomiędzy Cys i ACR [18,19]. Synteza *in vitro* tego

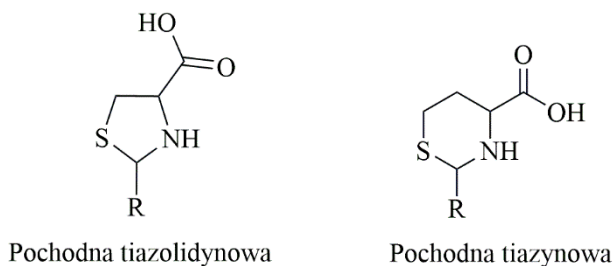
związku odbyła się w warunkach zbliżonych do fizjologicznych, w środowisku wodnym, w temperaturze pokojowej, bez udziału dodatkowych katalizatorów [20]. Struktura otrzymanego produktu została potwierdzona przy użyciu technik chromatografii cienkowarstwowej, spektrometrii mas oraz magnetycznego rezonansu jądrowego. Wykazano, że otrzymany produkt to kwas 2-[2-(2-amino-2-karboksyetylo)sulfanyloetylo]-1,3-tiazolidyno-4-karboksyowy, gdzie Cys i ACR występują w stosunku molowym 2:1. Jak wskazują autorzy tego odkrycia, kwas ten powstaje poprzez nukleofilową addycję Michaela jednej grupy -SH do wiązania podwójnego C=C w ACR i drugiej grupy -SH do grupy aldehydowej, a następnie cyklizację poprzez dehydratację. Przeprowadzono badania w celu poszukiwania odpowiedzi na pytanie czy wiązanie Cys z ACR może zmniejszać cytotoksyczność aldehydu. W tym celu przeprowadzono eksperyment na liniach komórkowych oskrzeli oraz jelit człowieka (komórki HBE oraz Caco-2), które poddawano działaniu ACR oraz powstałej pochodnej i mierzono m.in. ich żywotność. W wyniku przeprowadzonych badań ustalono, że powstała pochodna wykazuje dużo mniejszą cytotoksyczność niż sam aldehyd [20]. Autorzy pracy poczynili dodatkową obserwację dotyczącą stabilności otrzymanego diadduktu w warunkach fizjologicznych. Poddali go inkubacji w buforze fosforanowym o pH 7,4 oraz temperaturze 37°C i stwierdzili, że w tych warunkach jest on niestabilny. Zaobserwowali również, że ostatecznie tworzy się pochodna tiazolidynowa posiadająca jedną cząsteczkę Cys w swojej strukturze. Autorzy pracy wskazali, że oba addukty ulegały wzajemnej konwersji, a równowagę reakcji w kierunku tworzenia jedynie diadduktu przesunął dodatek Cys. Badania wykazały także, że monoaddukt był bardziej cytotoksyczny niż diaddukt. Udowodniona wysoka toksyczność ACR w stosunku do organizmu człowieka, może wskazywać na korzyści płynące z suplementacji lub diety bogatej w Cys, która tworzy z ACR pochodną o znacznie mniejszej toksyczności. Niestety nie zostały przeprowadzone dodatkowe badania w tym zakresie.

Dość dawno, bo w roku 1969, pojawiło się w literaturze doniesienie o uzyskaniu adduktu Cys i MDA [21]. Autor pracy zauważył, iż masa molowa pozyskanego związku odpowiada strukturze składającej się z dwóch cząsteczek Cys oraz trzech cząsteczek MDA. Kilkanaście lat później przeprowadzono reakcję pomiędzy MDA oraz Cys w warunkach zbliżonych do fizjologicznych (37°C, pH 7). Stwierdzono wówczas, że obie grupy funkcyjne występujące w Cys (-NH<sub>2</sub> i -SH) biorą udział w tworzeniu pochodnej. Niestety nie zostały przeprowadzone żadne dodatkowe badania, które jednoznacznie potwierdziłyby strukturę uzyskanej pochodnej [22]. Została ona potwierdzona za pomocą analizy elementarnej, MS oraz NMR dopiero

w roku 1991 [19]. Wykazano wówczas, że stosunek MDA do Cys w pochodnej wynosi 3:2. Kilkanaście lat później inna grupa badaczy ustaliła, że uzyskane przez nich w wyniku reakcji Cys z MDA, żółte ciało stałe jest mieszaniną izomerów, w których stosunek MDA do Cys wynosi 2:2 oraz 3:2. Reakcja została przeprowadzona w pH 7 i temperaturze 25°C, a struktury izomerów, w których zidentyfikowano także pierścień tiazolidynowy, zostały potwierdzone metodami spektroskopowymi [32].

4-HNE w swojej strukturze posiada trzy ugrupowania, które potencjalnie mogą wchodzić w reakcje z innymi cząsteczkami. Są to: grupa aldehydowa, wiązanie podwójne C=C oraz grupa hydroksylowa. To, która z wymienionych grup ulegnie reakcji zależy od rodzaju reagenta oraz środowiska. Wykazano m.in., że Glu łatwo reaguje w obojętnych roztworach wodnych z 4-HNE, a produkt reakcji ulega wewnątrzcząsteczkowemu przegrupowaniu do pięcioczłonowego cyklicznego hemiacetalu, który stanowi główny produkt końcowy. Analogiczna reakcja zachodzi w przypadku gdy obojętny roztwór Cys zostanie zmieszany z równomolową ilością 4-HNE. Jeżeli natomiast Cys znajdzie się w roztworze w nadmiarze to grupa aldehydowa kondensuje z drugą cząsteczką aminokwasu, a produktem tej reakcji jest pochodna tiazolidynowa [19]. Addukty tiolowe 4-hydroksyalkenali w pierwszym etapie generują cykliczne półacetale, które mogą następnie tworzyć pochodne tiazolidynowe, jednak reakcja ich tworzenia zachodzi wolniej [23].

Produktem reakcji pomiędzy CA oraz Cys, w przeciwieństwie do pochodnej Cys i ACR oraz 4-HNE, jest jedynie diaddukt, czyli pochodna tiazolidynowa. Nie tworzy się hemiacetal ponieważ reakcja kondensacji drugiej cząsteczki Cys zachodzi bardzo szybko [19].



Rysunek 3. Poglądowe struktury chemiczne pochodnej tiazolidynowej i tiazynowej  
Figure 3. Chemical structures of thiazolidine and thiazine derivative

#### 1.4. Aminokwasy tiolowe i wybrane endogenne aldehydy w stanach (pato)fizjologicznych w organizmie człowieka

W warunkach fizjologicznych Cys jest wbudowywana w białka, gdzie m.in. dzięki tworzeniu wiązań disiarczkowych, odpowiada za utrzymanie ich stabilności. Jest także prekursorem koenzymu A i Glu [1]. Stanowi również główny składnik budulcowy keratyny włosów, skóry oraz paznokci. Warunkuje ich wytrzymałość chemiczną oraz fizyczną. Odgrywa ona również kluczową rolę w wielu procesach komórkowych, takich jak detoksykacja metali oraz ksenobiotyków. W warunkach fizjologicznych występuje w komórkach na niskim poziomie, co stanowi swego rodzaju mechanizm obronny przed jej toksycznością, szczególnie w stosunku do centralnego układu nerwowego [24]. Oznaczana jest często w moczu i służy jako jeden ze wskaźników rozwijających się chorób nerek. Cys stanowi także marker rozwoju chorób dziedzicznych, takich jak cystynoza oraz cystynuria, w których przebiegu jej stężenie w moczu związane jest z możliwością rozwoju kamicy nerkowej [25].

W przypadku Hcy jej stężenie w warunkach fizjologicznych jest utrzymywane na niskim poziomie, dzięki remetylacji do Met i przemianom katabolicznym na drodze transsulfuracji. Przekształcenia te są kontrolowane przez reakcje enzymatyczne [26]. W osoczu zdrowego człowieka stężenie całkowitej Hcy utrzymuje się na poziomie 5 – 15  $\mu\text{mol/l}$ , a wszelkie wartości wykraczające poza ten zakres mogą świadczyć o rozwijającej się lub trwającej w organizmie chorobie. Zaburzenia w ilości Hcy w osoczu mogą wynikać z żywieniowych niedoborów jej kofaktorów, przewlekłych chorób, leczenia, czynników fizjologicznych oraz stylu życia, w tym spożywania alkoholu czy palenia papierosów [27]. Podwyższony poziom Hcy w osoczu, określany mianem hiperhomocysteinemii, stanowi czynnik ryzyka rozwoju niektórych chorób, w szczególności zaś chorób układu krążenia [26].

FA jest substancją silnie toksyczną, która przez Międzynarodową Agencję Badań nad Rakiem (*International Agency for Research of Cancer - IARC*) sklasyfikowana została jako rakotwórcza dla ludzi. FA działa drażniąco na spojówkę oczu a także na błony śluzowe dróg oddechowych. Powoduje ponadto zaburzenia oddychania i podrażnienia skóry [7]. Wydalany jest z organizmu po przekształceniu, w postaci ditlenku węgla i wody z wydychanym powietrzem oraz w niezmienionej formie przez nerki [6].

W warunkach fizjologicznych AA reaguje między innymi z aminami biogennymi, hemoglobina oraz grupami -SH białek. Wytwarzany jest także przez mikroflorę bakteryjną górnych dróg oddechowych i przewodu pokarmowego na drodze fermentacji węglowodanów [28]. AA ze względu na swój elektrofilowy

charakter łatwo reaguje ze związkami nukleofilowymi, do których zalicza się np. aminokwasy, białka i tiole. Reaktywność ta sprawia, iż jest on silnym mutagenem i klasyfikuje się go jako czynnik rakotwórczy. Detoksykowany jest w znacznej mierze poprzez utlenianie za pośrednictwem dehydrogenazy aldehydowej do kwasu octowego, który następnie wchodzi w cykl kwasu cytrynowego [29].

W organizmach żywych PLP stanowi kofaktor enzymów katalizujących przebieg wielu ważnych reakcji. Bierze udział między innymi w produkcji tryptofanu, serotoniny, kwasu solnego w żołądku oraz formowaniu hemoglobiny i czerwonych krwinek. Odgrywa także kluczową rolę we wspieraniu zarówno wrodzonej, jak i nabytej odporności organizmu poprzez udział w produkcji mikroflory jelitowej [30]. Wykazano, że PLP odgrywa istotną rolę w funkcjonowaniu układu krążenia [31], a jego niedobór może prowadzić do rozwoju miażdżycy czy udaru. Wykazano również, że PLP uczestniczy w kondensacji Hcy z seryną, której jest katalizatorem a reakcja ta stanowi pierwszy etap szlaku transsulfuracji.

ACR jako silny elektrofil, który charakteryzuje się dobrą rozpuszczalnością w wodzie, szybko przemieszcza się przez błony komórkowe na skutek dyfuzji, a w konsekwencji wywołuje szereg niekorzystnych reakcji fizjologicznych. Niszczy np. endogenne układy antyoksydacyjne poprzez wzmocnienie tworzenia reaktywnych form tlenu w komórkach, co ostatecznie prowadzi m.in. do przzerwiania błony komórkowej [20]. ACR jest klasyfikowana jako związek drażniący, wysoce toksyczny oraz potencjalnie kancerogenny. Toksyczność ACR została obszernie omówiona w wielu publikacjach, gdzie sugeruje się jej powiązanie z występowaniem różnych stanów patologicznych, takich jak rak płuc, choroba Alzheimera czy miażdżycy [32,33].

Wykazano powiązanie występowania podwyższonego poziomu 4-HNE w przebiegu chorób, takich jak choroba Alzheimera czy Parkinsona, ponieważ może on łączyć się np. z Cys w białkach [5], która wykazuje w stosunku do niego większe powinowactwo niż histamina czy lizyna.

Uważa się, że oznaczenie poziomu MDA jako końcowego produktu peroksydacji lipidów w określonej tkance jest markerem występującego w niej stresu oksydacyjnego, natomiast poziom MDA w osoczu i moczu reprezentuje stres oksydacyjny „całego ciała” [34].

Wdychanie oparów CA może prowadzić do podrażnienia oczu, nosa, gardła oraz płuc a w konsekwencji powodować ucisk w klatce piersiowej czy duszności [35].

## 2. Oznaczanie wybranych tiazolidynowych pochodnych

### 2.1. Tiazolidynowa pochodna cysteiny i formaldehydu

Wykazano, że wyniku kondensacji FA z Cys powstaje kwas 1,3-tiazolidyno-4-karboksyłowy (TCA), a reakcja ta zachodzi w roztworach wodnych w szerokim zakresie pH. Wykazano również, że TCA może działać jako przeciwutleniacz i zmiatacz wolnych rodników, chroniąc w ten sposób błony komórkowe przed negatywnymi skutkami ich działania. Wpływa to na opóźnianie starzenia, np. w komórkach wątroby, które wraz z wiekiem ulegają coraz to większej degradacji. TCA sprzedawany jest także jako suplement diety pod nazwą tioprolina, która posiada właściwości hepatoprotekcyjne, przeciwzapalne i przeciwcukrzycowe [36]. Opracowano metodę wykorzystującą technikę chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas (LC-MS/MS), która umożliwia oznaczanie TCA w próbach płynnych pożywek do hodowli bakterii. Metoda jest dedykowana w szczególności do TCA produkowanego przez pałeczki okrężnicy (*Escherichia coli*), które poddane były działaniu FA [37]. Metoda wykorzystuje chloromrówczan etylu do derywatywacji analitu w celu zwiększenia jego hydrofobowości, a same próbki były dodatkowo oczyszczane techniką ekstrakcji do fazy stałej i zateżane poprzez odparowanie do sucha i ponowne rozpuszczenie w acetonitrylu (ACN) [37]. Opracowana została także metoda wykorzystująca wysokosprawną chromatografię cieczową sprzężoną z detekcją spektrofotometryczną (HPLC-UV) do oznaczania TCA w osoczu pacjentów chorych na raka szyi i głowy, którym podawano tioprolinę. Procedura przygotowania próbki osocza obejmowała jej odbiałczenie poprzez dodatek kwasu chlorowego(VII), a następnie jej odwirowanie. Uzyskany roztwór z nad osadu, tzw. *supernatant* był następnie wprowadzany do układu chromatograficznego [36].

Ze względu na fakt, że TCA jest wydalany przez nerki opracowano metodę jego oznaczania w moczu szczurów. Oznaczenia miały odpowiedzieć na pytanie czy TCA w tym płynie fizjologicznym może stanowić istotny wskaźnik w biologicznym monitorowaniu narażenia na FA. W tym celu szczury podzielone na trzy grupy były poddawane inhalacjom powietrzem czystym oraz powietrzem zawierającym niskie i wysokie stężenie FA. Procedura przygotowania pobranych od zwierząt próbek moczu obejmowała derywatyzację analitu przy użyciu chloromrówczanu etylu oraz ekstrakcję za pomocą toluenu. Fazę organiczną po ekstrakcji odparowano, a następnie pozostałość rozpuszczono w octanie etylu i poddano analizie chromatograficznej [38]. Stwierdzono, że w stosunku do próby kontrolnej poziom TCA znacząco wzrósł w moczu szczurów poddawanych inhalacji powietrzem o wysokiej zawartości FA.

### 2.2. Tiazolidynowa pochodna cysteiny i acetaldehydu

Produkt reakcji pomiędzy Cys i AA nosi nazwę kwasu 2-metylo-1,3-tiazolidyno-4-karboksylowego (MTCA). Podobnie jak w przypadku TCA reakcja pomiędzy Cys a AA zachodzi w warunkach fizjologicznych, przy czym tempo powstawania pochodnej jest uzależnione od stężenia aldehydu. Można więc zaryzykować stwierdzenie, że synteza MTCA stanowi mechanizm chroniący organizm przed toksycznym działaniem AA. Taki tok rozumowania wspiera hipotezę, że jest on substancją chroniącą organizm człowieka przed występowaniem negatywnych skutków nadmiernego spożycia alkoholu, np. nowotworem przewodu pokarmowego. Powstała pochodna nie jest uważana za substancję toksyczną. W celu monitorowania obecności i stężenia MTCA w osoczu i moczu człowieka została opracowana metoda bazująca na technice LC-MS/MS [29]. W przypadku tej metody procedura przygotowania próbki obejmuje jej odbiałczenie (w przypadku osocza) przy użyciu ACN oraz przeprowadzenie analitu w pochodną za pomocą bezwodnika octowego w środowisku buforu węglanowego o pH 9,9, w celu m.in. zapewnienia stabilności związku [29]. Została również opracowana metoda jednoczesnego oznaczania TCA i MTCA w moczu, oparta na derywatywacji za pomocą chloromrówczanu etylu. Próbkę po etapie derywatywacji chemicznej poddawana była ekstrakcji toluenem, następnie faza organiczna była odparowywana a pozostałość była rozpuszczana w octanie etylu i poddawana analizie chromatograficznej. Technika pomiarową w tym przypadku była chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS), a jako wzorzec wewnętrzny wykorzystano deuterowany MTCA [38].

### 2.3. Tiazolidynowa pochodna cysteiny i fosforanu 5'-pirydoksalu

Dane literaturowe wskazują, że możliwa jest reakcja pomiędzy Cys a PLP w środowisku wodnym, a jej produktem jest kwas 2-(3-hydrokso-5-fosfonooksymetylo-2-metylo-4-pirydylo)-1,3-tiazolidyno-4-karboksylowy (HPPTCA). Reakcja zachodzi w szerokim zakresie pH, w tym w warunkach imitujących fizjologiczne [39,40]. Rola jaką wspomniana pochodna pełni w organizmie człowieka nie została jak dotąd określona. Można natomiast wysnuć pewne hipotezy w tym zakresie. Po pierwsze, tworzenie HPPTCA może prowadzić do niedoborów witaminy B<sub>6</sub>, co pociągałoby za sobą szereg niepożądanych skutków ze względu na rolę jaką PLP odgrywa w procesach biochemicznych. Z drugiej jednak strony rozkładowi HPPTCA w warunkach fizjologicznych towarzyszy odtworzenie substratów (Cys oraz PLP), co może wskazywać, że pochodna ta może stanowić swoisty rezerwuar witaminy B<sub>6</sub> w organizmach żywych [16]. W przeciwieństwie do

TCA i MTCA, tiazolidynowa pochodna Cys i PLP jest nietrwała, m.in. dlatego też nie jest dostępna komercyjnie. Jak wspomniano wcześniej aminokwasy tiolowe pełnią wiele ważnych funkcji w organizmie. Jest to powód, dla którego jedna z opracowanych metod umożliwia jednocześnie oznaczenie HPPTCA oraz czterech najważniejszych aminokwasów tiolowych występujących w organizmie człowieka [41], w tym Cys oraz Hcy. Przed poddaniem próbki osocza analizie z wykorzystaniem techniki HPLC-UV w procedurze przygotowania próbki zastosowano redukcję wiązań disiarczkowych przy użyciu *tris*(2-karboksyetylo)fosfiny, konwersję analitów w odpowiednie pochodne z wykorzystaniem tetrafluoroboranu 2-chloro-1-metylocholinoliniowego oraz odbiałczenie kwasem chlorowym (VII). W innej metodzie do oznaczania HPPTCA w osoczu człowieka wykorzystano technikę GC-MS. W tym przypadku bardzo istotnym elementem procedury przygotowania próbki jest odbiałczenie osocza na drodze ultrafiltracji przy wykorzystaniu filtrów typu *cut-off*. Otrzymany filtrat był następnie odparowywany do sucha w koncentratorze próżniowym, po czym dodawana była mieszanina derywatyzująca, w której skład wchodziły *N*-trimetylosililo-*N*-metylotrifluoroacetamid z dodatkiem 1% chlorku trimetylosilanu oraz pirydyna [16].

### 3. Metody oznaczania wybranych tiazynowych pochodnych

#### 3.1. Tiazynowa pochodna homocysteiny i formaldehydu

Produktem reakcji kondensacji Hcy z FA w środowisku wodnym jest kwas 1,3-tiazyno-4-karboksyłowy (homo-TCA), a reakcja zachodzi w warunkach imitujących warunki fizjologiczne [42]. Produkt powstaje w środowisku wodnym o szerokim zakresie pH, mieszczącym się w przedziale 5 - 10. Stwierdzono, że szybkość tej reakcji zależy od pH środowiska ze wskazaniem, iż zachodzi ona szybciej w środowisku o odczynie kwaśnym. Wykazano, że reakcja pomiędzy wspomnianymi substancjami zachodzi również w organizmie człowieka a utworzona tiazyna jest obecna w moczu [17]. W badaniach wykorzystano technikę GC-MS. Procedura przygotowania próbki obejmowała m.in. modyfikację chemiczną analitu za pomocą chloromrówczanu izobutyłu. Celem tego zabiegu było uzyskanie stabilnej i lotnej pochodnej. Rolę katalizatora w tej reakcji pełniła pirydyna. W następnym etapie uzyskana pochodna była ekstrahowana z mieszaniny reakcyjnej przy pomocy octanu etylu i w takiej formie natychmiast poddawana była analizie chromatograficznej ze względu na bardzo ograniczoną stabilność.



### 3.2. Tiazynowa pochodna homocysteiny i acetaldehydu

Produktem nieenzymatycznej i odwracalnej reakcji Hcy z AA jest kwas 2-metylotetrahydro-1,3-tiazyno-4-karboksylowy (homo-MTCA). Dotychczas nie opracowano jednak metody, która umożliwiłaby potwierdzenie obecności tej pochodnej w płynach biologicznych człowieka. Autorzy pracy podjęli jednak próbę adaptowania chromatograficznej metody oznaczania pochodnej Cys i AA w próbkach osocza i moczu na potrzeby przeprowadzenia badań wstępnych w tym zakresie [29]. Metoda ta opiera się na wykorzystaniu techniki LC-MS/MS. W omawianym przypadku procedura przygotowania próbki obejmowała zasadniczo dwa etapy. Pierwszym z nich (szczególnie w przypadku próbek osocza) było ich odbiałczenie za pomocą dodatku ACN oraz wirowanie. Drugi etap stanowiła konwersja analitu w pochodną za pomocą bezwodnika octowego w celu zwiększenia stabilności analitu. Reakcja derywatywacji przebiegała w środowisku buforu węglanowego o pH 9,9 w temperaturze 37 °C. Po upływie 30 minut próbki poddano analizie chromatograficznej. Co istotne, wykorzystanie tego narzędzia analitycznego nie umożliwiło potwierdzenia/wykluczenia obecności homo-MTCA w analizowanych próbkach moczu i osocza.

### 3.3. Tiazynowa pochodna homocysteiny i fosforanu 5'-pirydoksalu

Produktem nieenzymatycznej i odwracalnej reakcji Hcy z PLP jest kwas 2-pirydoksylo-1,4-tiazyno-4-karboksylowy (Hcy-PLP). Co ciekawe reakcja tego typu zachodzi w warunkach imitujących fizjologiczne (*in vitro*). Dotychczas nie opracowano metody umożliwiającej potwierdzenie obecności i oznaczenie Hcy-PLP w próbkach płynów biologicznych człowieka. Biorąc pod uwagę fakt, że zarówno PLP oraz Hcy są składnikami osocza czy też moczu, można przypuszczać, że produkty tych reakcji powinny być również obecne we wspomnianym materiale. Autorzy pracy [14] wskazali natomiast możliwość wykorzystania PLP jako odczynnika derywatyżującego tiole, takie jak Hcy i Cys. Zaprojektowana przez nich metoda wykorzystuje na etapie analizy technikę HPLC-UV i umożliwia oznaczenie całkowitej zawartości Hcy i Cys w próbkach osocza. W omawianym przypadku procedura przygotowania próbek do analizy chromatograficznej obejmuje kilka etapów, takich jak redukcja wiązań disiarczkowych, derywatywacja oraz odbiałczanie. W pierwszym etapie do próbek osocza dodano bufor fosforanowy o pH 7,8 oraz odczynnik redukujący wiązania disiarczkowe – *tris*(2-karboksyetylo)fosfinę. Po upływie 15 minut próbki potraktowano roztworem PLP i pozostawiono na 15 minut w temperaturze 45°C. Po upływie wskazanego czasu zawartości próbek poddano działaniu kwasu chlorowego(VII), a następnie odwirowano w celu

usunięcia białek z osocza. Uzyskany *supernatant* poddawano analizie chromatograficznej.

## UWAGI KOŃCOWE

Tiazynowe oraz tiazolidynowe pochodne aminokwasów tiolowych i endogennych aldehydów stanowią niezmiernie interesujące obiekty badań. Ich rola w organizmach żywych jest praktycznie nieznaną, dlatego też bardzo ważne jest stworzenie odpowiednich narzędzi analitycznych, które umożliwią monitorowanie ich stężenia w płynach biologicznych. Ułatwi to poszukiwanie potencjalnego związku pomiędzy ich zawartością a rozwojem chorób. Istnieje tym samym realna potrzeba opracowywania nowych oraz ciągłego udoskonalania opisanych już, nielicznych metod, tak aby były one proste, szybkie i zgodne z zasadami zielonej chemii, a przy tym aby umożliwiały oznaczanie wspomnianych związków w różnych matrycach, z jak najlepszą dokładnością i precyzją.

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] Y. Hashim, N. Ismail, P. Jamal, R. Othman, H. Salleh, *Int. J. Biotechnol. Wellness Ind.*, 2014, **3**, 95.
- [2] P. O'Brien, A. Siraki, N. Shangari, *Crit. Rev. Toxicol.*, 2005, **35**, 609.
- [3] R.P. Dator, M.J. Solivio, P.W. Villalta, S. Balbo, *Toxics.*, 2019, **7**, 1.
- [4] A. Ahmed Laskar, H. Younus, *Drug Metab. Rev.*, 2019, **51**, 42.
- [5] G.P. Voulgaridou, I. Anastopoulos, R. Franco, M.I. Panayiotidis, A. Pappa, *Mutat. Res.*, 2011, **711**, 13.
- [6] M. Kupczewska- Dobecka, *Pod. i Metod. Oceny Środowiska Pr.*, 2008, **3**, 51.
- [7] J. Skowroń, *Przem. Chem.*, 2013, **92**, 181.
- [8] V.J. Feron, H.P. Til, F. de Vrijer, R.A. Woutersen, F.R. Cassee, P.J. van Bladeren, *Mutat. Res. Toxicol.*, 1991, **259**, 363.
- [9] E. Quertemont, V. Didone, *Alcohol Res. Heal.*, 2006, **29**, 258.
- [10] P.J. Stover, M.S. Fischer, *Vitamin B-6, Adv. Nutr.*, 2015, **6**, 132.
- [11] K. Uchida, M. Kanematsu, Y. Morimitsu, T. Osawa, N. Noguchi, E. Niki, *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, 16058.
- [12] J.F. Stevens, C.S. Maier, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2008, **52**, 7.
- [13] D. Del Rio, A.J. Stewart, N. Pellegrini, *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, 2005, **15**, 316.
- [14] R. Głowacki, J. Stachniuk, K. Borowczyk, H. Jakubowski, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, **408**, 1935.
- [15] J.J. Pesek, J.H. Frost, *Tetrahedron.*, 1975, **31**, 907.
- [16] J. Piechocka, M. Wrońska, I.E. Głowacka, R. Głowacki, *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, **21**, 1.
- [17] J. Piechocka, N. Litwicka, R. Głowacki, *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, **23**, 1.
- [18] Q. Zhu, Z. Sun, Y. Jiang, F. Chen, M. Wang, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2011, **55**, 1375.
- [19] H. Esterbauer, R.J. Schaur, H. Zollner, *Free Radic. Biol. Med.*, 1991, **11**, 81.
- [20] Z. Yin, K. Jiang, L. Shi, J. Fei, J. Zheng, S. Ou, J. Ou, *J. Hazard. Mater.*, 2020, **387**, 121686.
- [21] H. Buttikus, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1969, **46**, 88.
- [22] K. Kikugawa, Y. Machida, M. Kida, T. Kurechi, *Chem. Pharm. Bull.*, 1981, **29**, 3003.
- [23] H. Esterbauer, A. Ertl, N. Scholz, *Tetrahedron.*, 1976, **32**, 285.
- [24] L. Włodek, E. Bald, *Biotiole w warunkach fizjologicznych, patologicznych i w terapii*, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, 2003.
- [25] K. Kuśmierk, R. Głowacki, E. Bald, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, **385**, 855.
- [26] T. Toyooka, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2009, **877**, 3318.
- [27] K. Rasmussen, J. Moller, *Ann. Clin. Biochem.*, 2000, **37**, 627.
- [28] A.W. Jones, *Alcohol Alcohol.*, 1995, **30**, 271.

- [29] R.J. Reischl, W. Bicker, T. Keller, G. Lamprecht, W. Lindner, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, **404**, 1779.
- [30] K. Stach, W. Stach, K. Augoff, *Nutr.*, 2021, **13**, 3229.
- [31] H. Hellmann, S. Mooney, *Molecules*, 2010, **15**, 442.
- [32] M. Singh, D.T. Nam, M. Arseneault, C. Ramassamy, *J. Alzheimer's Dis.*, 2010, **21**, 741.
- [33] A. Moghe, S. Ghare, B. Lamoreau, M. Mohammad, S. Barve, C. McClain, S. Joshi-Barve, *Toxicol. Sci.*, 2015, **143**, 242.
- [34] T. Weitner, S. Inić, J. Jablan, M. Gabričević, A.M. Domijan, *Croat. Chem. Acta.*, 2016, **89**, 133.
- [35] A. Suryanarayanan, *Encycl. Toxicol. Third Ed.*, 2014, **1**, 1072.
- [36] J. Lankelma, P.G.M. Penders, A. Leyva, H.M. Pinedo, *Cncr Lett.*, 1981, **12**, 131.
- [37] J. Liu, W. Chan, *Chem. Res. Toxicol.*, 2015, **28**, 394.
- [38] H.S. Shin, H.S. Ann, B.H. Lee, *J. Mass Spectrom.*, 2007, **42**, 1225.
- [39] M. V. Buell, R.E. Hansen, *J. Am. Chem. Soc.*, 1960, **82**, 6042.
- [40] F. Bergel, K. Harrap, *J.Chem.Soc.*, 1961, **789**, 4051.
- [41] J. Piechocka, M. Wyszczelska-Rokiel, R. Głowacki, *Sci. Rep.*, 2023, **13**, 1.
- [42] J.C. Wriston, C.G. Mackenzie, *J. Biol. Chem.*, 1957, **225**, 607.

Praca wpłynęła do Redakcji 22 marca 2024 r.

