

## JONY CYTRYNIANOWE - ROLE FIZJOLOGICZNE, ZASTOSOWANIE FARMAKOTERAPEUTYCZNE ORAZ POTENCJALNE ZNACZENIE W INŻYNIERII BIOMATERIAŁOWEJ

Mateusz Karasiewicz<sup>1\*</sup>, Sylwester Krukowski<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Studenckie Koło Naukowe „SPECTRUM” przy Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Wydział Farmaceutyczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny

<sup>2</sup> Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Wydział Farmaceutyczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

\* autor korespondujący, tel: +48 783 471 663, e-mail: [karasiewicz.mateusz@gmail.com](mailto:karasiewicz.mateusz@gmail.com)

Otrzymany 26.02.2016, zaakceptowany 04.06.2016, zamieszczony 30.06.2016

### STRESZCZENIE

W artykule przedstawiono fizjologiczne role jonów cytrynianowych, ich złożony udział w procesach metabolicznych oraz lokalizację w komórkach ludzkiego organizmu. Ponadto opisano zastosowania terapeutyczne, także te, które obecnie są w fazie testów. Stosunkowo nowym kierunkiem badań jest wykorzystanie cytrynianów w dziedzinie inżynierii biomateriałowej, otwierające nowe możliwości zastosowań w medycynie i farmacji.

**SŁOWA KLUCZOWE:** cytryniany, metabolizm, struktura kości, biomateriały kośćcozastępcze, kamica nerkowa, dna moczanowa

### ABSTRACT

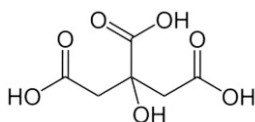
CITRATE IONS - THEIR PHYSIOLOGICAL FUNCTIONS, PHARMACOTHERAPEUTIC APPLICATIONS, AND POTENTIAL ROLE IN BIOMATERIALS ENGINEERING

The topics of this review are the physiological functions of citrate ions, their complex contribution to metabolic processes, as well as their localization within cells of the human body. Moreover, therapeutic applications of citrates are discussed, including those currently at the testing stage. A relatively new direction of research is the use of citrates in biomaterials engineering, an approach that leads to possible novel applications in medicine and pharmacy.

**KEYWORDS:** citrates, metabolism, bone structure, bone replacement biomaterials, nephrolithiasis, gout

### 1. Wprowadzenie

Kwas cytrynowy (Ryc. 1.) to trójkarboksylowy kwas organiczny z grupy hydroksykwasów. Najpowszechniej występującymi w naturze, a także najczęściej stosowanymi w terapii solami tego kwasu są cytryniany magnezu, potasu oraz sodu.

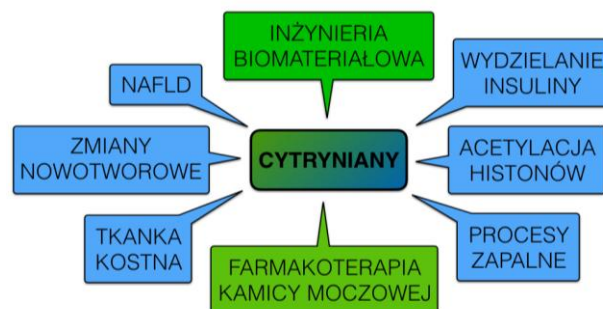


Ryc. 1. Wzór cząsteczkowy kwasu cytrynowego.

Kwas cytrynowy i jego sole znajdują szerokie zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym, a także spożywczym jako regulatory kwasowości i przeciwutleniacze [1,2]. *In vivo* cytryniany biorą udział w wielu szlakach metabolicznych, odgrywając tym samym istotne role w procesach fizjologicznych. Stanowią ponadto jeden z organicznych komponentów tkanki kostnej. Najnowsze wyniki badań wskazują na możliwości nowych zastosowań farmakoterapeutycznych oraz wykorzystanie w inżynierii biomateriałów, co stanowi treść niniejszego artykułu.

peutycznych oraz wykorzystanie w inżynierii biomateriałów, co stanowi treść niniejszego artykułu.

Role fizjologiczne i zastosowania biomedyczne cytrynianów przedstawiono schematycznie na Ryc.2.



Ryc. 2. Role fizjologiczne (tło niebieskie) i zastosowania biomedyczne (tło zielone) cytrynianów.

## 2. Role fizjologiczne cytrynianów

Jony cytrynianowe, obecne w każdej komórce, pełnią wiele funkcji bezpośrednio związanych z jej metabolizmem. Biorą one udział w licznych reakcjach biochemicznych, między innymi w ciągu przemian reakcji zapalnej, cyklu kwasu cytrynowego, procesach nowotworowych, acetytacji białek histonowych oraz wydzielaniu insuliny (rozwiniecie poniżej). Ponadto, badania z wykorzystaniem metod chromatografii cieczowej sprzężonej z spektrometrią mas oraz magnetycznego rezonansu jądrowego [3-5] wykazały zmiany stężenia tych jonów w komórkach u pacjentów z niealkoholową stłuszczeniową chorobą wątroby (NAFLD) oraz rakiem prostaty, co daje kolejne dowody ich uczestnictwa i złożonej roli w metabolizmie komórek, a tym samym w fizjologii i patofizjologii całego organizmu.

### 2.1. Cytryniany w przemianach reakcji zapalnej

W trakcie reakcji zapalnej komórki przechodzą wiele przemian metabolicznych, w których również cytryniany odgrywają bardzo istotną rolę. Badania makrofagów potraktowanych endotoksynami bakteryjnymi (LPS) [6] pozwoliły zaobserwować obniżoną ekspresję genów zaangażowanych w metabolizm mitochondrialny, np. genów kodujących złożone podjednostki białkowe łańcucha oddechowego i nośnika nukleotydu adeninowego. Zaobserwowano, że komórki zaczynają przechodzić ze stanu spoczynku, w trakcie którego generują ATP, do stanu aktywności, zostaje tym samym pobudzona glikoliza, a w jej wyniku powstają większe ilości ATP oraz inne półprodukty, które dla makrofagów stanowią substraty do produkcji mediatorów stanu zapalnego. Aktywność enzymów mitochondrialnych zaangażowanych w cykl Krebsa zostaje zahamowana, przez co ostatecznie procesy kataboliczne również zostają zahamowane, a anaboliczne - uruchomione. Kwas cytrynowy zostaje wycofany z cyklu i przetransportowany z mitochondriów do cytosolu, gdzie jest rozkładany do acetylo-CoA, który stanowi substrat do produkcji kwasu arachidonowego, źródła między innymi prostaglandyn i leukotrienów, należących do mediatorów stanu zapalnego [7,8].

Mitochondrialne przekaźniki komórkowe pełnią funkcję regulatorową względem produkcji mediatorów reakcji zapalnej, co zostało wykazane w cyklu prac z zastosowaniem siRNA oraz inhibitorów tzw. białkowego nośnika cytrynianów (CIC). Ponadto, po zahamowaniu aktywności genu kodującego CIC za pomocą siRNA obserwowano spadek eksportu cytrynianów z mitochondrium, prowadzący do obniżenia produkcji prostaglandyn. W tym eksperymencie udowodniono, że promotor genu kodującego CIC jest zaangażowany w pobudzanie makrofagów zależne od endotoksyn bakteryjnych, co pozwoliło postawić hipotezę, iż cytryniany pełnią kluczową rolę w indukcji makrofagów zależnej od LPS [6-8].

### 2.2. Cytryniany w przemianach nowotworowych

Przemiany nowotworowe w komórkach powodują zmiany ich morfologii, funkcji, ale również zmiany metaboliczne, warunkujące ich proliferację oraz rozrost (hiperplazję) danej tkanki. Kompleks kinaz PI3K/AKT (patrz wykaz skrótów) jest jednym z czynników regulujących wzrost, metabolizm, przeżycie, oraz proliferację komórki. Aktywny kompleks PI3K/AKT powoduje pobudzenie białkowych transporterów glukozy (GLUT) i wzmożony jej transport do komórki, gdzie proces glikolizy ulega aktywacji [9,10]. In-

nym istotnym efektem działania kompleksu PI3K/AKT są zmiany w metabolizmie cytrynianów - wykazano, że aktywacja tego kompleksu w komórkach nowotworowych powoduje także pobudzenie ekspresji genu kodującego CIC, co z kolei warunkuje zwiększone zapotrzebowanie na cytryniany w cytoplazmie. Ich eksport z mitochondriów podtrzymuje wówczas glikolizę, mitochondrialną fosforylację oksydacyjną, produkcję ATP oraz stabilizuje potencjał błonowy [11]. Jak opisano powyżej, geny kodujące CIC ulegają intensywniejszej ekspresji w komórkach nowotworowych, lecz z kolei ich represja pociąga za sobą cały łańcuch reakcji, prowadzących ostatecznie do osłabienia oddychania wewnątrzkomórkowego, autofagii mitochondriów i śmierci komórki. Przeprowadzone doświadczenie pozwala stwierdzić istotną rolę cytoplazmatycznych cytrynianów w zmutowanych komórkach [12].

Mitochondrialne cytryniany zużywane są także w szlaku mewalonowym, który warunkuje prenylację białek Ras i Rho - następuje przyłączenie izoprenoidu do ich cząsteczek, umożliwiające zakotwiczenie w błonie komórkowej, co w konsekwencji doprowadza do mutacji nowotworowych i przerzutów [13,14].

Opisane przemiany wskazują na istotny udział cytrynianów w molekularnym podłożu przemian nowotworowych.

### 2.3. Rola cytrynianów w sekrecji insuliny

Wydzielanie insuliny przez komórki B trzustki to proces kontrolowany wieloma mechanizmami. Jeden z komponentów ścieżki sygnałowej, prowadzącej do wydzielania tego hormonu, powoduje indukowany glukozą wzrost stosunku ATP/ADP, co z kolei blokuje kanały potasowe i aktywuje napięciowe kanały wapniowe [15]. Wiadomo również, że cykl metaboliczny pirogronianu oraz izocytrynianu stanowi ważny element kontroli sekrecji insuliny stymulowanej glukozą (GSIS), co wykazano na komórkach trzustki szczura. Z badań tych wynika, iż cykl obejmuje eksport cytrynianów z mitochondriów za pomocą białek CIC, a następnie szereg przemian w cytosolu, który ostatecznie prowadzi do powstania pirogronianu [16,17]. W opisanych badaniach dokonano supresji genu kodującego CIC przez adenowirusy i benzotriazol (BTA), co skutkowało zahamowaniem wydzielania insuliny stymulowanego glukozą. Z drugiej strony, wzmożenie GSIS oraz wzrost stężenia cytrynianów w cytoplazmie następowały w wyniku pobudzenia ekspresji genu kodującego CIC. Opisane wyniki eksperymentów wskazują na istotną rolę cytrynianów jako ważnego czynnika metabolicznego w procesie wydzielania insuliny. Rolę sygnałową wobec sekrecji insuliny może pełnić również  $\alpha$ -ketoglutaran ( $\alpha$ -KG). Wykazano to poprzez wyciszenie genu kodującego dehydrogenazę izocytrynianową przekształcającą izocytrynian w  $\alpha$ -KG, co skutkowało osłabieniem GSIS [18].

### 2.4. Rola cytrynianów w acetytacji histonów

Modyfikacje chemiczne histonów to jeden z podstawowych i najbardziej efektywnych mechanizmów modelowania chromatyny i regulacji dostępu do poszczególnych genów. Najbardziej powszechnymi modyfikacjami są acetylacja i deacetylacja histonów, katalizowane przez odpowiednie enzymy (acetylotransferaza i histonowa deacetylaza) [19]. Acetylacja to proces, powodujący częściową dekondensację chromatyny, co istotnie wpływa na dostęp do niej czynników transkrypcyjnych. Cały mechanizm jest jedną z głównych metod regulacji transkrypcji. Wynika z tego, iż

zahamowanie acetylacji może spowodować znaczne zmniejszenie, bądź nawet całkowite zablokowanie procesu transkrypcji, na skutek braku dostępu do poszczególnych genów w obrębie chromatyny. Proces acetylacji jest regulowany zmianami stężenia acetylo-CoA, który powstaje w wyniku reakcji cytrynianu pochodzenia mitochondrialnego z łąką ATP-cytrynianową (ACLY). Można zatem stwierdzić, że cytryniany uczestniczą w przemianach, które ostatecznie prowadzą do acetylacji histonów.

Kluczowa okazuje się również rola nośnika CIC jako transportera cytrynianów z mitochondrium, co udowodnili Morciano i wsp., hamując ekspresję genu kodującego CIC. To skutkowało ostatecznie znacznym obniżeniem stopnia acetylacji histonów, spowodowanym brakiem cytrynianów w cytosolu. Co więcej, w komórkach poddanych działaniu siRNA następuje spadek ekspresji genu CIC o około 70%, co z kolei prowadzi do obniżenia stężenia cytrynianów w cytosolu, zaburzenia procesu acetylacji i deacetylacji, a ostatecznie do poważnych zmian w strukturze chromosomów, jak np. powstawanie mostów chromosomowych [20].

## 2.5. Rola cytrynianów w niealkoholowej stłuszczeniowej chorobie wątroby (NAFLD)

NAFLD to stłuszczenie wątroby wywołane przez różne czynniki, inne niż alkohol. Podstawowymi przyczynami są tu otyłość i powiązane z nią zaburzenia metaboliczne, oraz cukrzyca typu 2. Największe znaczenie w rozwoju choroby ma insulinooporność, która prowadzi do odkładania się nadmiernej ilości tłuszczu w hepatocytach [21]. Wykazano, że stanowi temu towarzyszy zwiększenie stężenia cytrynianów w cytosolu, spowodowane wzrostem ilości wolnych kwasów tłuszczowych (w procesie  $\beta$ -oksydacji kwasów tłuszczowych powstaje acetylo-CoA, substrat do syntezy cytrynianów) oraz glukozy, przy czym wzrost ten związany jest z zaburzeniami metabolicznymi. Wykazano, że nadtlenuk wodoru w połączeniu z podwyższonym stężeniem cytrynianów wywołuje stres oksydacyjny, jednakże w przypadku braku nadtlenuk wodoru stan stresu oksydacyjnego nie występuje, co wskazuje na pośrednią rolę cytrynianów [3]. Mechanizm molekularny wspomnianych przemian nie jest do końca poznany, jednak najbardziej prawdopodobna jest hipoteza, że cytryniany chelatują żelazo, wypierając je z kompleksu z ferrytyną, po czym nowy kompleks [jony żelaza-cytrynian] indukuje powstawanie wolnych rodników hydroksylowych. Proponowany mechanizm może wskazywać, że cytryniany, chelatując żelazo, pełnią pośrednią rolę wobec indukcji powstawania wolnych rodników, a przez to patologicznych zmian w hepatocytach [22-24].

## 2.6. Cytryniany w komórkach prostaty

U ssaków największe stężenia cytrynianów, biorąc pod uwagę ich rozkład w organizmie, występują w komórkach prostaty, co spowodowane jest zdolnością tych komórek do wytwarzania cytrynianów „netto”. Przy standardowym metabolizmie u ssaków, atomy węgla pochodzące pierwotnie z cytrynianów są metabolizowane do szczawiooctanu (OAA) oraz uwalniane jako CO<sub>2</sub> (cykl Krebsa). Cechą charakterystyczną komórek prostaty jest to, że kumulując cytryniany doprowadzają do braku OAA i acetylo-CoA. Pierwszy ze związków jest dostarczany jako produkt transaminacji asparaginianu, natomiast drugi pochodzi z utleniania glukozy. Opisany proces pozwala na uzupełnienie braków w komórce [25,26]. Utrzymanie wysokich stężeń cytrynianów w komórkach prostaty jest możliwe dzięki zablokowaniu

ich utleniania. Osiągane jest to za pomocą mitochondrialnych zapasów cynku (3-5  $\mu$ mol/g), który hamuje aktywność m-akonitazy, katalizującej przejście cytrynianu do izocytrynianu. Ponadto, w komórkach prostaty wykazano ograniczoną aktywność ACLY, co pomaga w zachowaniu zapasów cytrynianów i utrzymanie ich odpowiednio wysokich stężeń specyficznych dla tego gruczołu [27].

## 3. Zastosowanie cytrynianów w farmakoterapii

W leczeniu stosuje się wiele leków, zawierających sole cytrynianowe (np. cytrynian butamiratu, fentanylu, sildenafilu), jednakże ich działanie nie dotyczy anionów cytrynianowych, lecz złożonego kationu organicznego. Jednak w użyciu są także leki, których właściwą substancją terapeutyczną są cytryniany (obecnie dwa zarejestrowane preparaty), a ich działanie wynika najczęściej z faktu, że stanowią stosunkowo mocne zasady Brönsteda. Pierwszy z preparatów zawiera substancję aktywną w postaci cytrynianu potasu (680 mg, tabletki o zmodyfikowanym uwalnianiu). Stosowany jest u pacjentów z wapniową kamicą nerkową, u których obserwuje się niskie stężenie wydalanych z moczem cytrynianów. Cytrynian potasu pełni tutaj rolę inhibitora reakcji powstawania kamieni nerkowych, w których skład wchodzi głównie szczawian i fosforan wapnia. Cytryniany przez podwyższenie pH moczu spowalniają wzrost kamieni i tworzenie się nowych zarodków kamicy. Lek powoduje również spowolnienie zużycia endogennych cytrynianów oraz zwiększone ich wydalanie przez nerki [28].

Drugi preparat stosowany w postaci granulatu do sporządzenia roztworu doustnego jest mieszaniną cytrynianu potasu, cytrynianu sodu oraz kwasu cytrynowego (46,4 g + 39,1 g + 14,5 g na 100 g granulatu). Stosowany jest w przypadkach kamicy dróg moczowych złożonej z kwasu moczowego i moczanów oraz u pacjentów z dną moczanową. Cytryniany zawarte w leku mają zdolność stopniowego rozpuszczania złożeń soli kwasu moczowego. W moczcu o niskim pH kwas moczowy wytrąca się w postaci trudno rozpuszczalnych soli. Ze względu na właściwości buforujące, lek zwiększa pH moczu i pozwala na powolne rozpuszczanie się powstałych złożeń [29]. Obecnie preparat znajduje się na liście leków refundowanych.

Poza opisanymi wyżej zastosowaniami cytrynianów w terapii, na uwagę zasługują badania dotyczące testowania cytrynianów w leczeniu zmian nowotworowych. Uważa się, że zwiększona ilość cytrynianu w komórkach rakowych zatrzymuje transkrypcję genów kodujących fosfofruktokinazę, prowadząc tym samym do zahamowania glikolizy, wszystkich szlaków energetycznych, oraz pobudzenia zużycia ATP. Powoduje to zatrzymanie wzrostu komórki i ostatecznie jej śmierć [30,31]. Antynowotworowe działanie cytrynianów *in vitro* zostało wykazane przez zespół Lu i wsp. na dwóch liniach komórek ludzkiego raka żołądka. Komórki hodowane były na odpowiednich podłożach zawierających różne stężenia cytrynianów (5-220 mmol/L) oraz poddawane ocenie żywotności, morfologii oraz stopnia apoptozy (metodą *Western blot*) w czasie 24-72 godzin. Badanie jednoznacznie pokazało silną aktywność cytotoxyczną cytrynianów w stosunku do obu badanych linii komórek raka żołądka [31].

## 4. Cytryniany jako komponent tkanki kostnej

Układ kostny tworzy ludzki szkielet, który spełnia wiele funkcji - między innymi stanowi mechaniczną podporę oraz

ochrania inne narządy, a także jest rezerwuarem jonów  $\text{Ca}^{2+}$ . Tkanka kostna może występować w formie zbitej lub gąbczastej, a odpowiedni stosunek obu, wraz z ułożeniem przestrzennym, tworzy kość. Kości mają różnorodne kształty, w zależności od spełnianych funkcji i połączeń z innymi elementami organizmu. Tkanka ta jest bardzo dynamiczna, stale ulega przebudowie pod wpływem czynników hormonalnych i fizycznych [32]. Skład chemiczny kości przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Zawartość procentowa (% wagowy) składników tkanki kostnej [33].

Składniki kości	Zawartość [%]
<b>Mineralne</b>	
Hydroksyapatyt	60-66
Węglany (głównie jako apatyt węglanowy)	-4
$\text{Na}^+$	-0,7
$\text{Mg}^{2+}$	-0,5
<b>Organiczne</b>	
Kolagen	20-25
Cytryniany	-0,9
Inne białka (osteokalcyna, osteonektyna, osteopontyna)	2-3
Inne (polisacharydy, lipidy, cytokiny)	ilości śladowe
<b>Woda</b>	8-9

Szczególnie istotny, zwłaszcza z punktu widzenia inżynierii biomateriałowej, jest minerał kostny, klasyfikowany jako hydroksyapatyt. W jego skład wchodzi jony:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{OH}^-$  oraz  $\text{PO}_4^{3-}$ , a tak zwany stechiometryczny hydroksyapatyt można przedstawić wzorem  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Jednak grupy fosforanowe są stosunkowo łatwo podstawiane między innymi przez węglany (nazywane wtedy węglanami typu B), a jony wapnia przez jony magnezu, sodu czy potasu. Z kolei w miejsce grup  $\text{OH}^-$ , mogą podstawić się chlorki, fluorki, a także węglany, (nazywane wówczas węglanami typu A). Obecność poszczególnych jonów wpływa między innymi na aktywność enzymów związanych z tkanką kostną, ale zmienia także właściwości mechaniczne minerału [34].

Istotnym organicznym składnikiem tkanki kostnej, jest kolagen typu I - główne białko kostne. Pojedyncza cząsteczka fibrylnej skleroproteiny kolagenu zbudowana jest z trzech skręconych spiralnie łańcuchów polipeptydowych, złożonych z 19-105 reszt aminokwasowych, tworząc tzw. superhelisę. Pierwszorzędowa sekwencja kolagenu kostnego to powtarzający się fragment trzech reszt aminokwasów: Gly-X-Y, gdzie X to głównie prolina, a Y to hydroksyprolina lub hydroksylizyna, przy czym glicyna stanowi około 30% wszystkich aminokwasów. Z kolei występowanie hydroksylowanej proliny i lizyny znamienne jest niemal tylko dla kolagenu kostnego [35].

Składnikami kości są również cytryniany, ściśle związane z powierzchnią kryształów hydroksyapatytowych. Ich szczegółowa lokalizacja w tkance kostnej została udowodniona metodą NMR poprzez zbadanie odległości od apatytu oraz wykazanie braku ruchów cząsteczek o dużej amplitudzie. Po usunięciu cytrynianów z kości za pomocą rozcieńczonego kwasu na gorąco i zastąpieniu ich cytrynianami

znakowanymi węglem C-13, oznaczono dokładne jego odległości od warstwy apatytowej. Dwa z trzech karboksylowych węgli cytrynianu znajdują się bliżej powierzchni, co pokazuje, że jego cząsteczka jest delikatnie nachylona w stosunku do powierzchni apatytu [36].

Cytryniany odgrywają także istotną rolę w procesach przebudowy kości. Przede wszystkim w postaci zaadsorbowanej na powierzchni kryształów minerału kostnego stabilizują je zapobiegając nadmiernemu przyrostowi, jak i nadmiernej resorpcji, przez co utrzymywana jest naturalna nanostruktura. Dodatkową funkcją, która związana jest z bardzo niewielką odległością cytrynianów od powierzchni apatytowych, jest łączenie sąsiednich warstw mineralnych. Cytryniany pełnią tutaj rolę „mostu” pomiędzy dwiema powierzchniami hydroksyapatytu. Ponadto niepolarnie fragmenty cząsteczek cytrynianów oddziałują z niepolarnymi fragmentami reszt aminokwasowych włókien kolagenowych, co dodatkowo umacnia mechanicznie kość i zapewnia jej stabilność [36].

### 5. Potencjalne zastosowanie cytrynianów w inżynierii biomateriałowej

Ze względu na naturalne występowanie cytrynianów w kościach prowadzi się obecnie badania nad ich wykorzystaniem w inżynierii biomateriałów. Jak opisano wyżej, ich biologiczna funkcja w tkance kostnej wiąże się z kontrolowaniem wielkości nanokryształów apatytowych i stabilizowaniem ich. Zatem wykorzystanie cytrynianów w produkcji biomateriałów kośćozastępczych może okazać się pomocne w wytwarzaniu kryształów apatytu o określonej wielkości, tak, by były jak najbardziej wytrzymałe i zbliżone morfologicznie do swojej biologicznej formy. Przeprowadzone metodą NMR badania apatytu stabilizowanego cytrynianami potwierdziły tę hipotezę i w ten sposób udowodniono, że za pomocą cytrynianów można kontrolować wzrost kryształów syntetycznego hydroksyapatytu i przy tym zachować ich nanostrukturę. Wpływ frakcji cytrynianowej na apatyt zmienia się wraz ze zmianą stężenia cytrynianu. Zastosowanie stężenia zbliżonego do naturalnego powoduje wytworzenie biomimetycznego materiału kośćozastępczego oraz zwiększa biogodność materiału. Jak udowodniono, zwiększenie stężenia cytrynianów do 40 mmol/L powoduje, że frakcja fosforanowa staje się dominantą fazy mineralnej, co wykazano za pomocą badań NMR [37].

Hao i wsp. przeprowadzili doświadczenia mające na celu określenie wpływu cytrynianów na strukturę hydroksyapatytu (HA). Prowadzili oni syntezę apatytu metodą hydrotermalną, z użyciem cytrynianu sodu i propionamidu. Wykazali, że oba te związki powodują powstawanie porowatej nanostruktury HA. Poprzez zmiany czasu trwania syntezy badali mechanizm tworzenia się wspomnianej porowatości. W rezultacie wykazano, że kryształy minerału przechodzą z postaci nanopłaszczyzny do nanosfery wraz z upływem czasu trwania reakcji. Dzięki tym badaniom udało się zobrazować proces syntezy HA w obecności cytrynianów i ich wpływ na krystaliczność apatytu [38]. Podobne badania prowadzili również Jin i wsp. realizując syntezę hydroksyapatytów w obecności cytrynianów, a następnie sprawdzając wpływ temperatury oraz czasu trwania reakcji na morfologię, trwałość i rozmiar kryształów HA. Wykazano, że wzrost temperatury oraz wydłużenie czasu trwania syntezy powodują zwiększony stopień krystaliczności oraz większe rozmiary wydłużonych kryształów apatytu, jednak zmniejsza się jego stabilność w tej postaci. Doniesiono, że

w zmiennych warunkach średnica kryształów pozostaje dynamiczna, co znacznie obniża koloidalną stałość rozpadu HA, czyli rozpad cząsteczek koloidu w sposób jednostajny [39].

Wyniki badań Li są kolejnym przykładem wpływu cytrynianów na stopień krystaliczności hydroksyapatytu. W syntezie biomateriału użyto wodorotlenku wapnia oraz kwasu ortofosforowego(V) z dodatkiem kwasu cytrynowego i cytrynianu potasu w zmiennych proporcjach. Powstawanie kompleksu [Ca-cytrynian] powodowało zmiany siły jonowej roztworu oraz aktywności jonów, w zależności od stężenia cytrynianów. Stwierdzono również, że roztwór szybciej przesyca się kwasem cytrynowym niż jego solami. Dodatkowo, proces krystalizacji został wyjaśniony poprzez teorię mechanizmu zarodkowania kryształu i jego wzrostu w roztworze [40].

Martins i wsp. przeprowadzili badania nad rolą adsorbowanego oraz kompleksowanego wapniem cytrynianu (CaCit). Próbowali oni wyjaśnić rolę cytrynianu w postaci chelatu wapnia w ramach mechanizmu zarodkowania i wzrostu kryształów. Dowiedli, że stabilność kompleksu Ca-Cit ma decydujące znaczenie w dostępności wolnych jonów wapnia, a tym samym w zwiększaniu intensywności procesu zarodkowania. Natomiast adsorbowany cytrynian utrzymuje trwałość nanostruktury HA. Wykazano także istotne znaczenie pH w kontroli rozmiarów kryształów - utrzymywanie pH w zakresie 7,4-8,5 powoduje zmianę morfologii kryształów z mikrostruktury do nanostruktury [41].

Skwarek i wsp. opisali właściwości hydroksyapatytu otrzymywanego różnymi metodami. Prowadzili badania adsorpcji w zależności od stężenia kwasu cytrynowego, chlorku sodu oraz wartości pH. Wykazali również, że temperatura (do 800° C) nie ma znaczącego wpływu zarówno na czysty, jak i pokryty cytrynianami hydroksyapatyt. W artykule zawarto wyjaśnienie mechanizmu adsorpcji cytrynianów na HA, które pozwala lepiej zrozumieć istotę tego procesu i stanowi podstawę do kolejnych badań [42].

Przedstawione rezultaty badań wskazują, że cytryniany mogą stać się ważnymi związkami w inżynierii biomateriałów. Dzięki nim można manipulować wzrostem kryształów apatytu, ich stabilnością oraz morfologią, zależnie od chelatacji wapnia bądź adsorpcji na powierzchni kryształu. Łącząc obecność cytrynianów ze zmianami temperatury, pH i innych warunków reakcji, można otrzymać hydroksyapatyt bardzo zbliżony do biologicznego. Cytryniany stwarzają zatem nowe możliwości wytwarzania materiałów kościozastępczych o wysokiej biogodności.

## 6. Podsumowanie

Ze względu na udział w wielu istotnych przemianach biochemicznych, a także funkcje regulatorowe wobec różnych szlaków i reakcji, cytryniany stanowią cenny materiał badawczy oraz są związkami, których działanie należy poznać dokładniej.

Cytryniany mogą być punktem wyjścia w kierunku nowych badań w terapii przeciwnowotworowej, inżynierii biomateriałów oraz w rozpoznawaniu i diagnozowaniu wielu stanów patologicznych organizmu. Zmiany ich stężeń często mają znaczenie diagnostyczne wobec określonych schorzeń, np. raka prostaty. Stanowią ważny element przemian kontrolujących sekrecję insuliny oraz acetylację histonów. Zahamowanie wydzielania mitochondrialnego cytrynianów powoduje zaburzenia tych procesów, co wskazuje na ich decydującą rolę. Opisując biomedyczne zasto-

sowania cytrynianów, należy także pamiętać o ich zastosowaniu w farmakoterapii kamicy nerkowej i dny moczonowej.

Cytryniany jako komponent tkanki kostnej w istotny sposób regulują wielkość kryształów apatytu oraz pełnią rolę mostów łączących sąsiednie powierzchnie mineralne. Związki te są ważnym przedmiotem badań w ramach inżynierii biomateriałowej (biomateriały kościozastępcze apatyt-cytrynian), gdzie podstawowym zagadnieniem jest uzyskanie wysoce biogodnych materiałów implantologicznych.

Różnorodność ról fizjologicznych i lokalizacji cytrynianów w organizmie daje wiele możliwości do badań podstawowych i aplikacyjnych, których wyniki mogą być pomocne w leczeniu i diagnostyce chorób, bądź wpłynąć na poprawę jakości życia pacjentów z implantami.

## 7. Indeks skrótów

ACLY	(ATP citrate lyase) liaza ATP-cytrynianowa
ADP	adenozynodifosforan
ATP	adenozotrifosforan
BTA	benzotriazol
CaCit	kompleks wapń-cytrynian
CIC	(citrate carrier) białkowy nośnik cytrynianów
GLUT	(glucose transporter) białkowy transporter glukozy
Gly	glicyna
GSIS	(glucose stimulated insulin secretion) wydzielanie insuliny stymulowane glukozą
HA	(hydroxyapatite) hydroksyapatyt
LPS	lipopolisacharyd (endotoksyna bakteryjna)
NAD <sup>+</sup>	dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
NAFLD	(nonalcoholic fatty liver disease) niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby
NMR	(nuclear magnetic resonance) magnetyczny rezonans jądrowy
OAA	(oxaloacetic acid) szczawiooctan
α-KG	α-ketoglutaran
PI3K/AKT	kompleks kinazy 3-fosfatydyloinozytolu i kinazy serynowo-treoninowej
Ras	małe białko G kodowane przez protoonkogen Ras będący homologiem wirusowego onkogenu wirusa mięsaka myszy (rat sarcoma)
Rho	małe białko z rodziny białek G (Ras homologous)

## 8. Bibliografia

1. POCH S.A. Karta charakterystyki substancji/preparatu 2008.
2. Liu Ch., Caothien S., Hayes J., Caothuy T., Otoyoto T., Ogawa T., American Water Works Association 2001.
3. Van de Wier B., Balk J.M., Haenen G.R., Giamouridis D., Bakker J.A., Bast B.C., den Hartog G.J., Koek G.H., Bast A., FEBS Lett. 2013, 587, 2461-2466.
4. Hricak H., Br. J. Radiol. 2005,78, 103-111.
5. Kline E.E., Treat E.G., Aversa T.A., Davis M.S., Smith A.Y., Sillerud L.O., J. Urol. 2006, 176, 2274-2279.
6. Infantino V., Convertini P., Cucci L., Panaro M.A., Di Noia M.A., Calvello R., Palmieri F., Iacobazzi V., Biochem. J. 2011, 438, 433-436.
7. O'Neill L.A., Biochem. J. 2011, 438, e5-e6.
8. O'Neill L.A., Hardie D.G., Nature 2013, 493, 346-355.

9. Tannahill G.M., Curtis A.M., Adamik J., Palsson-McDermott E.M., McGettrick A.F., Goel G., Frezza C., Bernard N.J., Kelly B., Foley N.H., *Nature* 2013, 496, 238-242.
10. Wood I.S., Trayhurn P., *Br. J. Nutr.* 2003, 89, 3-9.
11. Catalina-Rodriguez O., Kolukula V.K., Tomita Y., Preet A., Palmieri F., Wellstein A., Byers S., Giaccia A.J., Glasgow E., Albanese C., *Oncotarget* 2012, 3, 1220-1235.
12. Bauer D.E., Hatzivassiliou G., Zhao F., Andreadis C., Thompson C.B., *Oncogene* 2005, 24, 6314-6322.
13. Armstrong S.A., Hannah V.C., Goldstein J.L., Brown M.S., *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 7864-7868.
14. Sebti S.M., *Cancer Cell* 2005, 7, 297-300.
15. MacDonald M.J., Fahien L.A., Brown L.J., Hasan N.M., Buss J.D., Kendrick M.A., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2005, 288, E1-E15.
16. Palmieri F., *Pflugers Arch.* 2004, 447, 689-709.
17. Castegna A., Scarcia P., Agrimi G., Palmieri L., Rottensteiner H., Spera I., Germinario L., Palmieri F., *J. Biol. Chem.* 2010, 285, 17359-17370.
18. Ronnebaum S.M., Ilkayeva O., Burgess S.C., Joseph J.W., Lu D., Stevens R.D., Becker T.C., Sherry A.D., Newgard C.B., Jensen M.V., *J. Biol. Chem.* 2006, 281, 30593-30602.
19. Węgleński P. (red.), *Genetyka molekularna*, PWN 2006.
20. Morciano P., Carrisi C., Capobianco L., Mannini L., Burgio G., Cestra G., De Benedetto G.E., Corona D.F., Musio A., Cenci G., *Hum. Mol. Genet.* 2009, 18, 4180-4188.
21. Alkiewicz J., Szczeklik A., *Choroby wewnętrzne*, t.1, MP 2005.
22. Gutteridge J.M., *Free Radic. Res. Commun.* 1990, 9, 119-125.
23. Goddard J.G., Gower J.D., Green C.J., *Free Radic. Res. Commun.* 1992, 17, 177-185.
24. Reif D.W., *Free Radic. Biol. Med.* 1992, 12, 417-427.
25. Kavanagh J.P., *Prostate* 1994, 24, 139-142.
26. Mazurek M.P., Prasad P.D., Gopal E., Fraser S.P., Bolt L., Rizaner N., Palmer C.P., Foster C.S., Palmieri F., Ganapathy V., *EMBO Rep.* 2010, 11, 431-437.
27. Costello L.C., Liu Y., Franklin R.B., Kennedy M.C., *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 28875-28881.
28. <http://pharmindex.pl/searchResultsSingle.php?oper=dc.la&pkid=8579>
29. <http://pharmindex.pl/searchResultsSingle.php?oper=dc.la&pkid=1037>
30. Zhang X., Varin E., Allouche S., Lu Y., Poulain L., Icard P., *Anti-cancer Res.* 2009, 29, 1249-1254.
31. Lu Y., Zhang X., Zhang H., Lan J., Huang G., Varin E., Lincet H., Poulain L., Icard P., *Anticancer Res.* 2011, 31, 797-805.
32. Sawicki W., Malejczyk J., *Histologia*, PZWL 2012.
33. Fikai A., Andronesu E., Voicu G., Fikai D., *Adv. Comp. Mat. Med. Nanotech.* 2011, 15-32.
34. Sobczak A., Kowalski Z., *Z 1-Ch/2007*, 149-158.
35. Cameron G.J., Cairns D.E., Wess, T.J., *J. Mol. Biol.* 2007, 372, 1097-1107.
36. Hu Y.Y., Rawal A., Schmidt-Rohr K., *PNAS* 2010, 107, 22425-22429.
37. Hu Y.Y., Liu X.P., Ma X., Rawal A., Prozorov T., Akinc M., Mallapragada S.K., Schmidt-Rohr K., *Chem. Master.* 2011, 23, 2481-2490.
38. Hao L., Yang H., Du S., Zhao N., Wang Y., *Mater. Lett.* 2014, 131, 252-254.
39. Jin X., Chen X., Cheng Y., Wang L., Hu B., Tan J., *J. Coll. Interf. Sci.* 2015, 450, 151-158.
40. Li Ch., *Powder Techn.* 2009, 192, 1-5.
41. Martins M.A., Santos C., Almeida M.M., Costa M.E.V., *J. Coll. Interf. Sci.* 2008, 318, 210-216.
42. Skwarek E., Janusz W., Sternik W., *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 2014, 299, 2027-2036.