



Autor: Corvelva



Tłumaczenie: Zespół Tłumaczy STOP NOP

## Vaccinegate

### Wstępne wyniki analizy szczepionki Hexacima/Hexyon

Analiza ilościowo-jakościowa związków organicznych ma ogromne znaczenie w dziedzinie farmakologii<sup>1</sup>, ponieważ potencjalne problemy związane z bezpieczeństwem preparatów wynikają z nowych procesów produkcji leków i z kompleksowych cech strukturalnych i biologicznych tych produktów<sup>2</sup>.

Przegląd dokumentacji rejestracyjnej szczepionek wojskowych, który znajdujemy w raporcie<sup>3</sup> końcowym „Komsji Parlamentarnej ds. Zubożalego Uranu”<sup>4</sup> ujawnił obecność zanieczyszczeń chemicznych i białkowych, które wymagały dalszych analiz.

Nasze stowarzyszenie zdecydowało się przejąć kontrolę nad powyższym raportem (na tyle na ile było to możliwe).

Ten projekt jest częścią wyżej wymienionych spostrzeżeń. Konieczne było zatem opracowanie technologii/metody pozwalającej na przeprowadzenie analizy szerokiego spektrum cząstek pochodzenia chemicznego, metabolicznego i białkowego, w celu oceny jakości uzyskanych wyników.

W związku z powyższym została opracowana metoda w oparciu o technologię SANIST w celu testowania szczepionek pod kątem czystości i bezpieczeństwa (więcej informacji poniżej)

#### Wyniki i dyskusja

##### 1. Analiza składników deklarowanych w ulotce szczepionki

| Składnik   | Obecność        | Rodzaj jonów       |
|------------|-----------------|--------------------|
| Aminokwasy | Tak             | [M+H] <sup>+</sup> |
| Sacharoza  | Tak             | [M+H] <sup>+</sup> |
| Neomycyna  | Nie odnaleziono | -                  |

|  |                 |                      |
|--|-----------------|----------------------|
| Formaldehyd <sup>6</sup>                               | Nie odnaleziono | -                    |
| Streptomycyna <sup>7</sup>                             | Nie odnaleziono | -                    |
| Aldehyd glutarowy                                      | Tak             | [M+H] <sup>+</sup>   |
| Trometamol <sup>8</sup>                                | Tak             | [M+H] <sup>+</sup>   |
| Dwufosforan sodu                                       | Niewykrywalny   |                      |
| Dwufosforan potasu                                     | Niewykrywalny   |                      |
| Toksoid błoniczy <sup>9</sup>                          | Tak             | [M+nH] <sup>n+</sup> |
| Toksoid tężcowy <sup>10</sup>                          | Tak             | [M+nH] <sup>n+</sup> |
| Toksoid krztuścowy <sup>11</sup>                       | Tak             | [M+nH] <sup>n+</sup> |
| Hemaglutynina<br>włókienkowa (FHA)                     | Tak             | [M+nH] <sup>n+</sup> |
| Polisacharyd Hemophilus<br>Influenzae B <sup>12</sup>  | Nie odnaleziono | -                    |
| Antygeny <i>Bordetella<br/>pertussis</i> <sup>13</sup> | Tak             | [M+nH] <sup>n+</sup> |
| Polimyksyna B  | Nie odnaleziono | -                    |
| Hepatitis B (Zapalenie<br>wątroby typ B)               | Nie odnaleziono | -                    |
| Poliowirus Typ1,2,3                                    | Nie odnaleziono | -                    |

<sup>1</sup> Lett Appl Microbiol. 2015 Feb;60(2):174-80. doi: 10.1111/lam.12355 ( <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25376111>)

<sup>2</sup> Fuchs F., Biochimie. 2002 Nov;84(11):1173-9 ( <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12595146>)

<sup>3</sup> <http://www.camera.it/leg17/491?idLegislatura=17&categoria=022bis&tipologiaDoc=documento&numero=023&doc=pdfel>

<sup>4</sup> [http://www.camera.it/leg17/436?shadow\\_organico\\_parlamentare=2588](http://www.camera.it/leg17/436?shadow_organico_parlamentare=2588)

<sup>5</sup> Albin A. et al., Front Endocrinol (Lausanne). 2018 Apr 5;9:110.doi:10.3389/fendo.2018.00110. (

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/m/pubmed/29674995/>)

<sup>6</sup> <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/formaldehyde>

<sup>7</sup> <https://en.wikipedia.org/wiki/Streptomycin>

<sup>8</sup> <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/tromethamine>

<sup>9</sup> <https://www.who.int/biologicals/vaccines/diphtheria/en/>

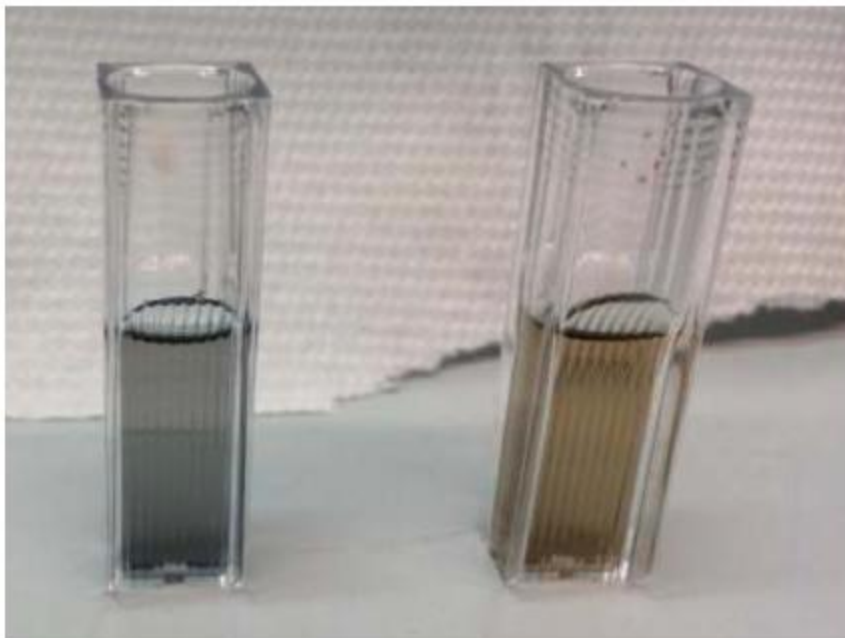
<sup>10</sup> <https://www.who.int/ith/vaccines/tetanus/en/>

<sup>11</sup> <http://www.who.int/biologicals/vaccines/pertussis/en/>

<sup>12</sup> [https://www.who.int/biologicals/areas/vaccines/haemophilus/haemophilus\\_influenzae\\_typeb\\_Hib/en/](https://www.who.int/biologicals/areas/vaccines/haemophilus/haemophilus_influenzae_typeb_Hib/en/)

## 2. Badanie frakcji białek

Zgodnie ze specyfikacjami producenta szczepionka Hexyon zawiera niektóre białka. Próbkę poddano analizie w celu identyfikacji białek. Obecność białek lub sekwencji peptydów jest potwierdzona przez niebieskie zabarwienie próbki w pierwszej wizualnej analizie. Na rysunku 1, po prawej stronie pusta fiolka (odczynnik Bradforda), a po lewej fiolka zawierająca ten sam odczynnik z dodatkiem frakcji szczepionki Hexyon, powodujący niebieskie zabarwienie roztworu.



**Rysunek 1.** Test Bradforda.

### **2.1 – 1<sup>a</sup> analiza: Test Bradforda**

Aby ustalić, czy białka są obecne, szczepionkę Hexyona poddano badaniu Bradforda. 300  $\mu$ l osmotycznej  $H_2O$  dodano do 200  $\mu$ l szczepionki, aby osiągnąć odpowiednią objętość: 500  $\mu$ l odczynnika Bradforda dodano do roztworu. Po analizie wizualnej obecność sekwencji białek lub peptydów została potwierdzona przez niebieskie zabarwienie próbki.

W oparciu o uprzednio wyznaczoną krzywą kalibracji stężenie białka oszacowano na 0,033 mg / ml

### **2.2 – 2<sup>a</sup> analiza: Trawienie takie jakie jest**

Po teście Bradforda próbka szczepionki została poddana trawieniu enzymatycznemu. 10  $\mu$ l pierwotnej próbki zostało potraktowane 50  $\mu$ l Trypsyny pozostawiono na noc w temp 37° C w przepływowym ogrzewaczu wody (Termoblock). Została przygotowana próbka kontrolna zawierająca hemoglobinę o stężeniu 1 mg / ml, która była traktowana jako próbka.

**W tej analizie wykryto obecność białek w próbce.**

### **2.3 – 3<sup>a</sup> analiza: Trawienie osadów**

Próbkę szczepionki poddano następnie drugiej analizie, w której frakcje stałą i ciekłą oddzielono przez odwirowanie.

Po odwirowaniu usunięto cały supernatant. Pozostałą strąconą frakcję stałą potraktowano następnie 30  $\mu$ l trypsyny i pozostawiono na noc w temp 37° C w przepływowym ogrzewaczu wody.

Przygotowano kontrolę hemoglobiny o stężeniu 1 mg / ml i poddano obróbce zgodnie z tą samą procedurą co próbkę szczepionki.

Po trawieniu, zarówno próbka szczepionki jak i kontrola zostały poddane wirowaniu. Supernatant został wyekstrahowany i umieszczony w fiolkach do analizy. Dodano 20 µl osmotycznej H<sub>2</sub>O w celu osiągnięcia dostatecznej do wstrzyknięcia objętości.

**W tej analizie wykryto obecność białek w próbce.**

W celu przetworzenia danych uzyskanych w ten sposób, początkowo wykorzystano bazę danych Mascot<sup>14</sup>

**Tabela 1 – Próbkę #1 (N3FI38V)\***

| <b>Nazwa Białka</b>  | <b>Baza danych</b> | <b>Masa cząsteczkowa (KDa)</b> | <b>Wynik</b>  | <b>Kod</b>            |
|--|--------------------|--------------------------------|---------------|-----------------------|
| włóknista hemaglutynina / adhezyna [Bordetella krztuśca]                                   | NCBIInr            | <b>330</b>                     | <b>222/50</b> | <b>SNW24549.1</b>     |
| łańcuch A, Struktura Izolowanej Katalitycznej Domeny Toksyny Błoniczej                     | NCBIInr            | <b>20</b>                      | <b>114/50</b> | <b>1DTP_A</b>         |
| łańcuch A, Binarny Kompleks Toksyny Krztuśca i Atp   | NCBIInr            | <b>26</b>                      | <b>76/50</b>  | <b>1BCP_A</b>         |
| Podjednostka alfa syntazy tryptofanu [Methylobacterium sp. 10]                             | NCBIInr            | <b>30</b>                      | <b>73/50</b>  | <b>WP_051439711.1</b> |
| domniemane białko warstwy S / amidaza N-acetylmuramoilo-L-alanina [Clostridium tetani E88] | NCBIInr            | <b>119</b>                     | <b>69/50</b>  | <b>AAO35094.1</b>     |
| łańcuch B, Kompleks Binarny Toksyny Krztuśca i   | NCBIInr            | <b>22</b>                      | <b>64/50</b>  | <b>1BCP_B</b>         |

|     |  |  |  |  |
|-----|--|--|--|--|
| Atp |  |  |  |  |
|-----|--|--|--|--|

**\*Białka zidentyfikowano bez uwzględnienia potencjalnych zmian potranslacyjnych. Przyjętą metodologią nie zidentyfikowano żadnych innych sekwencji.**

#### **Ocena toksyczności dla zidentyfikowanych sekwencji**

Nie można było ocenić wskaźnika toksyczności molekularnej na podstawie zidentyfikowanych sekwencji peptydów.

#### **Obecność wolnych peptydów**

Nie wykryto żadnych wolnych peptydów.

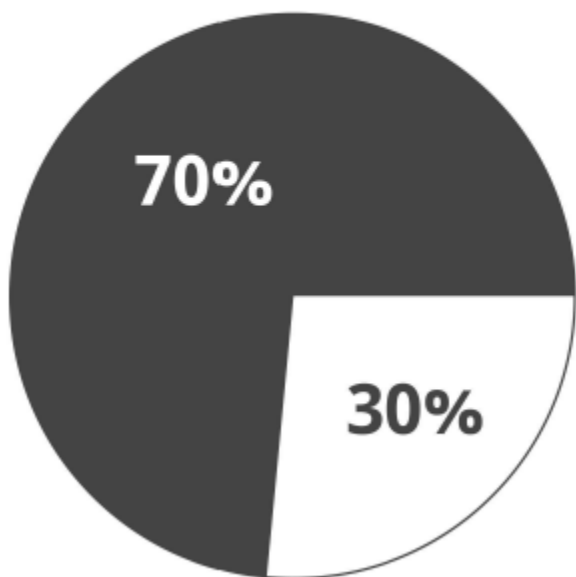
<sup>14</sup> [http://www.matrixscience.com/help/seq\\_db\\_setup\\_db\\_gui.html](http://www.matrixscience.com/help/seq_db_setup_db_gui.html)

### **3. Analiza frakcji metabolicznej**

Należy podkreślić, że to badanie przesiewowe dostarcza danych półilościowych, które odpowiadają zakresowi od nanogramów do mikrogramów jako orientacyjny rząd wielkości. W celu uzyskania dokładnych danych ilościowych konieczne będzie postępowanie z wykorzystaniem certyfikowanych standardów analitycznych o znanej czułości.

Poniżej przedstawiamy wyniki badań identyfikacyjnych uzyskane w dwóch badanych partiach:

### Batch #1 (N3FI38V)



**Ciemny obszar (70%)** - nieznane składniki

**Jasny obszar (30%)** - znane składniki

**W próbie zidentyfikowaliśmy 216 sygnałów, z czego tylko 30% znanych.**

UWAGI POTRZEBNE DO ZROZUMIENIA: jest to analiza pierwszego poziomu, która oznacza identyfikację opartą na masie cząsteczkowej. Jeśli wynik jest jednoznaczny (tj. przy zmierzonej masie cząsteczkowej tylko jeden związek pasuje) jest bardziej prawdopodobne, że jest to dokładnie ten związek, ale w tej fazie nie możemy mieć absolutnej pewności. Jak zauważysz, w odniesieniu do niektórych związków, różne substancje mogą korespondować z tą samą masą cząsteczkową. Konieczna jest zatem dalsza ukierunkowana analiza, z zachowaniem odpowiednich standardów, w celu potwierdzenia dokładnego związku chemicznego.

#### 3.1 Szczepionka Hexyon.

Wykryto **216 sygnałów**, z których tylko 30% dało potencjalną klasyfikację (tabela 2). Należy podkreślić, że proporcja sygnałów nie jest dokładnie skorelowana z proporcją związków, ponieważ w spektrometrii mas pojedynczy związek może generować kilka stosunków masy do ładunku ( $m/z$ ).

**Należy podkreślić, że dokładna nazwa związku chemicznego nie jest pewna i powinna być potwierdzona przez badanie drugiego poziomu przeprowadzane przy użyciu certyfikowanych norm analitycznych.**

W rzeczywistości, podczas badania przesiewowego urządzenie mierzy dane za pomocą dokładnej masy cząsteczkowej (błąd pomiaru <10 ppm). Formuła empiryczna jest obliczana na podstawie tych pomiarów. Pewnego rodzaju wzory chemiczne mogą tak samo opisywać różne związki chemiczne mające tę samą masę cząsteczkową.

UWAGI DO ZROZUMIENIA: w istocie, ustalono, że mamy kilka nieznanych sygnałów, których nie można zidentyfikować za pośrednictwem międzynarodowych baz danych.

Badano molekuly potencjalnie należące do kategorii toksyn. Zaproponowano je na podstawie dokładnych badań stosunku masy do ładunku m / z (błąd <10 ppm) używając bazy związków toksycznych Metlin. Tabela 3 pokazuje uzyskanych kandydatów.

#### 4. Ostateczne wnioski

Większość wykrytych zanieczyszczeń i nieczystości nie została scharakteryzowana przy użyciu baz danych dotyczących białek i metabolitów (KEGG, NCBI-Prot i SwissProt).<sup>8-9</sup>

Istnieje krytyczny problem związany z zanieczyszczeniem różnych związków potencjalnie lub zdecydowanie szkodliwych dla zdrowia ludzkiego.

**Krótko mówiąc, pierwsze pytanie, które zadaliśmy sobie i uzyskane względne odpowiedzi, są następujące**

|   |                                      |
|---|--------------------------------------|
| 1. Czy wymienione substancje chemiczne są obecne?           | Częściowo                            |
| 2. Czy występują jakiegokolwiek zanieczyszczenia chemiczne? | Tak                                  |
| 3. Ile jest związków zanieczyszczających?                   | Ponad 70                             |
| 4. Co to za związki?  | Toksyny chemiczne, związki chemiczne |

Następna analiza:

1. Przede wszystkim należy z całą pewnością zidentyfikować najciekawsze prawdopodobne związki
2. Następnie, aby określić dokładną ilość każdego zanieczyszczenia

#### 5. Przyszłe prace badawcze

Analiza potwierdzająca i analiza związków chemicznych będą wykonana przy użyciu techniki "Tandem Mass Spectrometry (MS / MS)" związanej z pomocą certyfikowanych standardów analitycznych. Analiza zostanie przeprowadzona zgodnie z dyrektywami europejskimi (dyrektywa UE 2002/657 / WE) przydatnymi do identyfikacji związków 29.

#### 6. Opis technologii SANIST

Innowacyjna międzynarodowa platforma SANIST, poprzez publikacje w recenzowanych czasopismach naukowych<sup>15-16</sup>, została wykorzystana do wykonania pierwszego badania przesiewowego identyfikacji szczepionek będących przedmiotem zainteresowania.

#### 7. Szczegóły dotyczące metody analitycznej.

Technologia SANIST składa się z:

- a) Zestaw do ekstrakcji analitów (nieznane substancje do określenia)

- b) System analizy LC-SACI/ESI-MS, który pozwala na redukcję szumu chemicznego spektrometrów mas i uzyskanie lepszego wykrywania sygnałów instrumentalnych;
- c) System orzetwarzania danych SANIST składający się z lokalnej platformy bioinformatycznej i sieciowej zdolnej do przetwarzania danych za pomocą dedykowanych baz danych i dostosowanych algorytmów. Wyszczególniono, że w fazie badania rozpoznawanie odbywa się w kontekście badań naukowych i oficjalnych bankach białek/związków (KEGG, NCBI-Prot i SwissProt)<sup>17-18</sup> bez pomocy certyfikowanych standardów analitycznych. Konieczne jest zatem przeprowadzenie analizy drugiego poziomu z zastosowaniem certyfikowanych standardów analitycznych w celu potwierdzenia rodzaju związków chemicznych

### 8. Obszary zastosowania technologii SANIST

Do tej pory platforma SANIST znajduje zastosowanie w następujących dziedzinach:

- a. W badaniach klinicznych markerów choroby i ich bezpośredniego zastosowania w diagnostyce.
- b. Usługi gastronomiczne, identyfikowanie żywności. Badania porównawcze w celu określenia jakości produktów na podstawie ich złożonego składu cząsteczkowego. Kontrola podrobów.
- c. Sektor Nutra, rozwój wartości odżywczej suplementu diety w oparciu o jego skład cząsteczkowy. Wyszukiwarka(np: dodane leki).
- d. Sektor farmaceutyczny, kontrola leków i badania aktywnych biocząsteczek.
- e. Przemysł kosmetyczny: skład molekularny produktów kosmetycznych może być uważnie monitorowany i skorelowany z jakością produktu.

### 9. Jak interpretować tabele.

To jest faza badań przesiewowych: przyrząd mierzy dane za pomocą dokładnej masy cząsteczkowej (błąd pomiaru <10ppm). Na podstawie tych miar oblicza się wzory chemiczne. Pewnego rodzaju wzory chemiczne mogą tak samo opisywać różne związki chemiczne mające tę samą masę cząsteczkową. Przykład pojedynczego powiązanego komponentu:

|                  |        |
|------------------|--------|
| 2-feniloacetamid | C8H9NO |
|------------------|--------|

W tym przykładzie przyrząd wykrył sygnał o określonej masie cząsteczkowej. Wstawiając wzór chemiczny do baz danych, możliwe byłopowiązanie danego wzoru z prawdopodobnym komponentem.

### 10. Tabele zanieczyszczeń

Tabela 2 – Próbka #1 (N3FI38V)

| Potencjalna klasyfikacja   | Wzór chemiczny | Stosunek m/z |
|--|----------------|--------------|
| 1-Palmitoilo-2- (5-keto-8-okso-6-oktenoilo-sn-glicero-3-fosfocholina | C32H58NO10P    | 648.3792725  |
| 2, 4, 6-Trihydroksybenzofenon  | C13H10O4       | 231.0650024  |
| 2, 4-diamino-6-nitrotoluen   | C7H9N3O2       | 168.0765686  |
| 2, 5-Dichloro-4-   | C6H4Cl2O5      | 226.9511973  |



|   |                  |             |
|---|------------------|-------------|
| oksoheks-2-enodionian   |                  |             |
| 2-Hydroksymetyloceram   | C6H9NO3          | 144.0629196 |
| Amid 2-N, 6-N-bis<br>(2,3-<br>dihydroksybenzoilo) -<br>L-lizyny | C20H23N3O7       | 418.1549835 |
| Kwas 2-okso-7-<br>metylotioheptanowy                            | C8H14O3S         | 191.0764275 |
| 2-fenyloacetamid  | C8H9NO           | 136.0754967 |
| 3-Buten-1-amina   | C4H9N            | 72.0809288  |
| 4'-O-<br>demetylobikamycyna                                     | C26H19CI2N3O7    | 556.0627441 |
| 5-<br>Metylotetrahydrofolian                                    | C20H25N7O6       | 460.2019119 |
| 7-Dezoksylo-anianian  | C16H24O9         | 361.1529999 |
| Acetylospiramycyna  | C45H76N2O15      | 443.2720133 |
| Adenina   | C5H5N5           | 136.0615883 |
| Amoksyclina   | C16H19N3O5S      | 366.1083069 |
| ANTU  | C11H10N2S        | 102.0338345 |
| Atovaquone  | C22H19ClO3       | 367.1093674 |
| Auriculine  | C31H45NO8        | 560.3268331 |
| Benzo[b]fluorene  | C17H12           | 217.0969086 |
| Bikaverin   | C20H14O8         | 383.0762405 |
| Bis-D-fruktoza 2 ',<br>1:2,1'-dianhydride                       | C12H20O10        | 325.1124496 |
| Karbenicylina sodowa.   | C17H16N2O6S2Na   | 423.063446  |
| Cefamandol sodu   | C18H17N6O5S2. Na | 485.0637894 |
| Celecoxib   | C17H14F3N3O2S    | 382.0821533 |
| Chivosazole F   | C41H57NO8        | 692.405426  |
| Chloral hydrate   | C2H3Cl3O2        | 164.9265976 |
| Deethylatrazine   | C6H10ClN5        | 188.0704498 |
| Dwuzasadowy fosforan<br>sodu                                    | Na2HPO4          | 142.9478836 |

|  |              |               |
|--|--------------|---------------|
| Fusaproliferin                                     | C27H40O5     | 445.2876994   |
| Gentisin   | C14H10O5     | 259.0637894   |
| Difosforan geranylu                                | C10H20O7P2   | 315.0794678   |
| 2-O-beta-D-glukozyd gibereliny                     | C25H32O11    | 509.2208182   |
| Gliotoksyna  | C13H14N2O4S2 | 327.0510406   |
| Glucobrassicin                                     | C16H20N2O9S2 | 449.066246    |
| Hydrocortisone cypionate                           | C29H42O6     | 487.2982686   |
| ▪  |              |               |
| ▪  |              |               |
| Justicidin B                                       | C21H16O6     | 365.1049805   |
| L-Arginina   | C6H14N4O2    | 175.1187363   |
| L-Lysine 1,6-lactam                                | C6H12N2O     | 129.1021729   |
| L-metionina  | C5H11NO2S    | 150.0582275   |
| Kwas Lowastatyny                                   | C24H38O6     | 423.2746124   |
| L-Pipekolan  | C6H11NO2     | 130.0861511   |
| L-treonina   | C4H9NO3      | 120.0654202   |
| L-Tryptofan  | C11H12N2O2   | 205.0969772   |
| L-tyrozyna   | C9H11NO3     | 182.0809784   |
| L-Valine   | C5H11NO2     | 118.0862541   |
| Mannitol   | C6H14O6      | 183.0843315   |
| Mibefradil   | C29H38FN3O3  | 496.3033905   |
| Mycinamicin IV                                     | C37H61NO11   | 696.4367879   |
| N-Acetylo-D-fukozamina                             | C8H15NO5     | 206.1002884   |
| Netilmicin   | C21H41N5O7   | 476.3059031   |
| N-Formylo-4-amino-5-aminometylo-2-metylopirymidyna | C7H10N4O     | 167.0,0464623 |
| Ophiobolina A                                      | C25H36O4     | 401.2615814   |
| Fenylopirogronian                                  | C9H8O3       | 165.0544624   |
| Phorbol 12-tiglate 13-decanoate                    | C35H52O8     | 601.3717499   |
| Piperidyndyna                                      | C5H11N       | 86.09650803   |
| Pymetrozine  | C10H11N5O    | 218.1002426   |
| Resolvin D1  | C22H32O5     | 377.2325999   |
| Senampeline A                                      | C25H31NO8    | 474.2177582   |
| Sildenafil   | C22H30N6O4S  | 475.2212067   |
| Sacharoza  | C12H22O11    | 343.1230164   |
| Sulfluramid  | C10H6F17NO2S | 527.9948934   |
| Tamsulosin   | C20H28N2O5S  | 409.1865997   |
| trans-cynamonian                                   | C9H8O2       | 149.0596352   |
| Walnemulin   | C31H52N2O5S  | 565.3616435   |

Tabela.3

| Stosunek masy do ładunku (m/z) | Cząsteczka* (wzór chemiczny)  |
|--------------------------------|---|
| 90.97666931                    | C2H3PS<br>C2H3ClSi  |
| 120.0807571                    | C8H9N   |
| 132.1054688                    | C6H12FN2  |
| 133.1051636                    | C7H16S  |
| 138.9197159                    | CK2O3   |
| 138.9305725                    | CH3AgO  |
| 174.1599579                    | C8H19N3O  |
| 180.9037399                    | C2H3Cl3OS   |
| 197.1006775                    | C8H17FO2S<br>C9H17LiS2  |
| 210.9352722                    | C3H5O3Sb<br>C6H3LiS4<br>C3H3IN2O                                      |
| 232.9172516                    | C5H3Cl3O4<br>C6H2BrFN2S<br><b>C5H4BrClF2O</b>                         |
| 242.9252167                    | C4H7BrN2OS2   |
| 262.9066467                    | C8H8Br2   |
| 278.9226532                    | C8H4CdO4<br>C7H7AgO3S<br>C6H14SSe2<br>C7HBrF6                         |
| 294.9385223                    | C7H7BrN2O4S<br>C6H2BCl3F4N2<br>C9H9BrCl2N2<br>C9H8ClIO<br>C6H10N2S2Sn |
| 300.9044952                    | C4H5BrN4O3S2<br>C8H7Cl2I<br>C4H12Sn2                                  |

\*wzory chemiczne, potencjalnie dopasowane do toksycznych związków