



AUTOREFERAT

Załącznik 2a do wniosku
o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

Dr Magdalena Makarska-Białokoz

UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ W LUBLINIE

Wydział Chemii

Zakład Chemii Nieorganicznej

Lublin, 2017

1. IMIĘ I NAZWISKO: Magdalena Makarska-Białokoz

Adres służbowy: Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
Wydział Chemii
Zakład Chemii Nieorganicznej
Pl. Marii Curie-Skłodowskiej 2
20-031 Lublin
tel. 81 537 57 45, fax: 81 533 33 48
e-mail: makarska@hektor.umcs.lublin.pl

2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE – Z PODANIEM NAZWY, MIEJSCA I ROKU ICH UZYSKANIA ORAZ TYTUŁU ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

- 17.06.1997** dyplom magistra
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Chemii;
kierunek: chemia podstawowa i stosowana
Tytuł pracy magisterskiej: *Badanie odzysków propofolu i tymolu z osocza i krwinek metodą ekstrakcji ciecz-ciecz*
Promotor: prof. dr hab. Andrzej L. Dawidowicz
- 24.09.2001** stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk chemicznych
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Chemii
Tytuł rozprawy doktorskiej: *Charakterystyka związków kompleksowych kationowych porfiryn rozpuszczalnych w wodzie*
Promotor: dr hab. Stanisław Radzki, prof. UMCS

3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

- 1.10.1997-24.09.2001** doktorant (Studia Doktoranckie na Wydziale Chemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie)
- 15.11.2001 – 30.09.2015** adiunkt w Zakładzie Chemii Nieorganicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
- 1.10.2015 – 30.09.2017** asystent w Zakładzie Chemii Nieorganicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

4. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCEGO Z ART. 16 UST. 2 Z DNIA 14 MARCA 2003 R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (Dz.U. Nr 65, Poz. 595 ze zm.)

a) tytuł osiągnięcia naukowego

Jednotematyczny cykl publikacji zatytułowany

Analiza spektroskopowa niekowalencyjnych oddziaływań układów makrocyklicznych (związków porfirynowych i białek) z substancjami biologicznie aktywnymi

b) spis publikacji będących podstawą do ubiegania się o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego

Podstawę postępowania habilitacyjnego stanowi cykl 8 pełnotekstowych artykułów [H1-H8] opublikowanych w latach 2012-2017. Prace te zostały uszeregowane zgodnie z rokiem opublikowania. Wartości IF są zgodne z rokiem opublikowania pracy. Wartości CI są zgodne ze wskazaniem bazy Web of Science z dn. 26.05.2017. Komentarz do tych publikacji zawarty w autoreferacie stanowi podsumowanie moich najważniejszych osiągnięć badawczych będących podstawą przedstawionej rozprawy habilitacyjnej i nie zawiera pełnego omówienia uzyskanych przeze mnie wyników.

[H1] M. Makarska-Białokoz

Spectroscopic study of porphyrin-caffeine interactions

Journal of Fluorescence, 22(6) (2012) 1521-1530

IF = 1.789, CI = 8

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na: stworzeniu koncepcji pracy, wykonaniu wszystkich doświadczeń do tej pracy, opracowaniu wszystkich wyników, wykonaniu wszystkich obliczeń, przygotowaniu rysunków i tabel, napisaniu całej pracy, korespondencji z edytorem oraz przygotowaniu odpowiedzi na recenzje. Mój udział procentowy szacuję na **100%**.

[H2] M. Makarska-Białokoz

Spectroscopic study of associated systems formed between water-soluble cationic porphyrins or their copper (II) complexes and nucleic building blocks

Central European Journal of Chemistry, 11(8) (2013) 1360-1367

IF = 1.329, CI = 7

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na: stworzeniu koncepcji pracy, wykonaniu wszystkich doświadczeń do tej pracy, opracowaniu wszystkich wyników, wykonaniu wszystkich obliczeń, przygotowaniu rysunków i tabel, napisaniu całej pracy, korespondencji z edytorem oraz przygotowaniu odpowiedzi na recenzje. Mój udział procentowy szacuję na **100%**.

[H3] M. Makarska-Białokoz

Fluorescence quenching effect of guanine interacting with water-soluble cationic porphyrin

Journal of Luminescence, 147 (2014) 27-33

IF = 2.719, CI = 13

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na: stworzeniu koncepcji pracy, wykonaniu wszystkich doświadczeń do tej pracy, opracowaniu wszystkich wyników, wykonaniu wszystkich obliczeń, przygotowaniu rysunków i tabel, napisaniu całej pracy, korespondencji z edytorem oraz przygotowaniu odpowiedzi na recenzje. Mój udział procentowy szacuję na **100%**.

[H4] M. Makarska-Białokoz

Spectroscopic evidence of xanthine compounds fluorescence quenching effect on water-soluble porphyrins

Journal of Molecular Structure, 1081 (2014) 224-232

IF = 1.602, CI = 6

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na: stworzeniu koncepcji pracy, wykonaniu wszystkich doświadczeń do tej pracy, opracowaniu wszystkich wyników, wykonaniu wszystkich obliczeń, przygotowaniu rysunków i tabel, napisaniu całej pracy, korespondencji z edytorem oraz przygotowaniu odpowiedzi na recenzje. Mój udział procentowy szacuję na **100%**.

[H5] M. Makarska-Białokoz, Piotr Borowski

Fluorescence quenching behaviour of uric acid interacting with water-soluble cationic porphyrin

Journal of Luminescence, 160 (2015) 110-118

IF = 2.693, CI = 3

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na: stworzeniu koncepcji pracy, wykonaniu wszystkich doświadczeń do tej pracy, wykonaniu obliczeń (oprócz obliczeń kwantowych), współudziale w opracowaniu wyników, współudziale w przygotowaniu rysunków i tabel, współredagowaniu pracy, korespondencji z edytorem oraz przygotowaniu odpowiedzi na recenzje. Mój udział procentowy szacuję na **80%**.

[H6] M. Makarska-Białokoz, A. Gładysz-Płaska

Spectroscopic analysis of porphyrin compounds irradiated with visible light in chloroform with addition of beta-myrcene

Journal of Molecular Structure, 1125 (2016) 103-112

IF = 1.780, CI = 0

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na: stworzeniu koncepcji pracy, wykonaniu wszystkich doświadczeń do tej pracy, opracowaniu wszystkich wyników, wykonaniu wszystkich obliczeń, współudziale w przygotowaniu rysunków i tabel, współudziale w napisaniu pracy, korespondencji z edytorem oraz redagowaniu odpowiedzi na recenzje. Mój udział procentowy szacuję na **90%**.

[H7] M. Makarska-Białokoz

Analysis of the binding interaction in uric acid – human hemoglobin system by spectroscopic techniques

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 178 (2017) 47-54

IF = 2.653, CI = 0

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na: stworzeniu koncepcji pracy, wykonaniu wszystkich doświadczeń do tej pracy, opracowaniu wszystkich wyników, wykonaniu wszystkich obliczeń, przygotowaniu rysunków i tabel, napisaniu całej pracy, korespondencji z edytorem oraz przygotowaniu odpowiedzi na recenzje. Mój udział procentowy szacuję na **100%**.

[H8] M. Makarska-Białokoz

Investigation of the binding affinity in vitamin B12 – bovine serum albumin system using various spectroscopic methods

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 184 (2017) 262-269

IF = 2.653, CI = 0

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na: stworzeniu koncepcji pracy, wykonaniu wszystkich doświadczeń do tej pracy, opracowaniu wszystkich wyników, wykonaniu wszystkich obliczeń, przygotowaniu rysunków i tabel, napisaniu całej pracy, korespondencji z edytorem oraz przygotowaniu odpowiedzi na recenzje. Mój udział procentowy szacuję na **100%**.

Sumaryczny impact factor (IF) jednotematycznego cyklu publikacji [H1-H8]: **17.218**

5. OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO WW. PRAC I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW WRAZ Z OMÓWIENIEM ICH EWENTUALNEGO WYKORZYSTANIA

Wprowadzenie

Jednym z ważniejszych problemów ekologicznych ludzkości jest rosnące z każdym dniem skażenie środowiska, będące skutkiem nie tylko działalności przemysłowej człowieka, ale w równym stopniu związane z życiem codziennym każdego z nas. Ostatnio do grona substancji przyczyniających się do zanieczyszczenia środowiska dołączyła kolejna grupa związków, czyli różnego typu substancje biologicznie aktywne, wchodzące zazwyczaj w skład leków i środków farmaceutycznych, ale też produktów żywnościowych, kosmetycznych i szerokiego spektrum używek [1, 2]. Olbrzymia ilość spożywanych lub stosowanych w inny sposób substancji biologicznie aktywnych, wchodzących w skład rozmaitych preparatów, które w założeniu mają pomagać w utrzymaniu zdrowia i odpowiedniej kondycji, oznacza jednocześnie podobnej wielkości produkcję ścieków z ich zawartością. Produkty te, zaliczane obecnie do kategorii tak zwanych *emerging pollutants* (kształtującej się nowej grupy zanieczyszczeń), nie są jeszcze objęte regulacjami dotyczącymi badania jakości wód gruntowych, lądowych i morskich. Niestety, dane literaturowe wskazują, że zawarte w produktach farmaceutycznych substancje biologicznie aktywne są dość odporne na działanie konwencjonalnych metod oczyszczania – nawet po zastosowaniu standardowych procedur oczyszczania wody można je wykryć u ujścia ścieków, w wodach powierzchniowych i gruntowych, czy w wodzie pitnej. Mimo że środki farmaceutyczne występują w wymienionych wodach w niskich stężeniach (ng/L), ich ilość w wodach powierzchniowych stale rośnie [3]. Stężenia wspomnianych substancji oznaczane w wodach powierzchniowych nie stanowią na razie śmiertelnego zagrożenia dla organizmów wodnych, ale warto pamiętać, że przewlekła ekspozycja na te środki podczas kluczowych faz cyklu rozwojowego organizmów na nie narażonych, a także prawdopodobieństwo synergistycznego działania mieszaniny środków farmaceutycznych lub ich metabolitów z innymi zanieczyszczeniami, mogą spowodować zagrożenie dla ekosystemów wodnych i lądowych. Dlatego zagadnienie monitorowania i oczyszczania wód z pozostałości leków i ich metabolitów, bądź innych produktów zawierających substancje biologicznie aktywne, stanowi kolejny problem do rozwiązania.

Głównym przedmiotem moich zainteresowań badawczych są zmiany właściwości spektroskopowych związków porfiryńowych, implikowane zmianą ich struktury na skutek

oddziaływania z substancjami o znaczeniu biologicznym, a także zmianami zachodzącymi w środowisku badanego układu. Porfiryny to aromatyczne związki makrocykliczne, występujące naturalnie w środowisku. Dzięki specyficznym właściwościom spektroskopowym, magnetycznym, luminescencyjnym, a szczególnie zdolności do fotoprzewodnictwa i fotoemisji, związki porfiryne pełnią fundamentalną rolę w wielu procesach zachodzących w przyrodzie. Do naturalnych związków porfiryne, zwanych niejednokrotnie *barwnikami życia*, należą m.in. hem i chlorofil, a także mioglobina, cytochromy, peroksydazy, bilirubina i kobalamina (witamina B₁₂). Wymienione układy spełniają podstawowe funkcje życiowe u roślin i zwierząt. Odpowiadając za proces fotosyntezy, oddychanie komórkowe, transport, akumulację i wymianę gazów, procesy krwiotwórcze, czy prawidłową pigmentację tkanek, związki porfiryne stały się niezbędnym elementem w procesie ewolucji organizmów żywych [4]. Dlatego zaburzenia w ich funkcjonowaniu prowadzić mogą do groźnych chorób, takich jak patologie krwi (anemia i porfirie), czy nowotwory.

Badania dotyczące budowy i właściwości fizykochemicznych porfiryn występujących w przyrodzie doprowadziły do syntezy sztucznych układów porfiryne. Duże zróżnicowanie takich układów oraz ich analogów, prezentujących unikalną strukturę i właściwości, pozwala na wykorzystanie ich w wielu dziedzinach nauki i przemysłu [5-7]. Porfiryny i ich kompleksy z metalami stosowane są m.in. do produkcji specyficznych barwników, półprzewodników, czy katalizatorów, w charakterze odczynników analitycznych, w procesie fotosterylizacji wody, czy w roli „elektronicznego nosa” – czujnika na lotne związki organiczne [8-11]. Równie przydatne okazały się porfiryny w medycynie, gdzie stosowane są do leczenia wybranych infekcji bakteryjnych [12] oraz jako sensybilizatory w fotodynamicznej terapii nowotworów PDT (*photodynamic therapy*) [13-15]. Swoją rolę mogą spełniać zarówno bezpośrednio wprowadzane do organizmu, a także jako substancje wchodzące w skład nowoczesnych materiałów stosowanych jako pokrycia światłowodów wykorzystywanych we wspomnianej terapii [16-18]. Niektóre porfiryny mają zdolność oddziaływania z DNA, powodując blokowanie odpowiednich jego fragmentów oraz zarówno chemiczne, jak i fotochemiczne rozszczepianie cząsteczki DNA [19].

Wspomniane wyżej charakterystyczne właściwości porfiryn, a także olbrzymia różnorodność ich zastosowań, czynią tę grupę związków bardzo popularnym i pożądanym materiałem badawczym. Dlatego po lekturze licznych artykułów dotyczących oddziaływania

porfiryn z wieloma rodzajami substancji nie miałam wątpliwości, że związki należące do tej klasy są idealnymi kandydatami do roli czujników pozwalających na monitorowanie różnego typu reakcji. Aby dowieść słuszności postawionej tezy, zdecydowałam się zbadać mechanizm oddziaływań zachodzących pomiędzy wybranymi układami porfirynewymi a związkami biologicznie aktywnymi przy użyciu odpowiednich technik spektroskopowych.

Biologicznie aktywne substancje, uzyskiwane najczęściej z materiału roślinnego, bądź będące składnikami organizmu ludzkiego czy zwierzęcego, stanowią ważną grupę związków wchodzących, jak już wspomniałam wcześniej, w skład całej gamy leków, suplementów, używek czy środków kosmetycznych i barwników. Zarówno ich budowa, jak i właściwości fizykochemiczne, stały się we współczesnej nauce tematem wielu badań [20-22]. Na szczególną uwagę zasługują zwłaszcza dwupierścieniowe związki aromatyczne, ze względu na ich dostępność, szerokie spektrum zastosowań lub istotną, często pozytywną rolę w funkcjonowaniu organizmu ludzkiego [23-25]. Duże zapotrzebowanie na tego typu substancje, a szczególnie związki metyloksantynowe, przyczynia się jednak do coraz większego zanieczyszczenia wód ich pozostałościami i metabolitami, dlatego moje zainteresowania badawcze skupiły się głównie na tej klasie związków.

Korzystne działanie związków biologicznie aktywnych na człowieka staje się jednak w pewnych sytuacjach dyskusyjne. Odpowiednie ilości przyjmowanych używek, czy suplementów, a także właściwie dobrane leki mają działanie prozdrowotne. Jednak spożywane (lub wytwarzane przez organizm) w nadmiernych ilościach i wydalane z moczem z organizmu nie tylko stanowią kolejne źródło zanieczyszczeń, ale przede wszystkim mogą prowadzić do różnego typu zaburzeń w funkcjonowaniu ludzkiego organizmu. Jako że główną drogą przenoszenia w organizmie tego typu związków jest układ krwionośny, to właśnie jego elementy odpowiedzialne za ten transport, takie jak białka krwi, są bezpośrednio narażone na zmiany struktury, które mogą wpływać na zaburzenia ich funkcji fizjologicznych.

Można więc zauważyć, że zarówno związki porfirynewe, jak i białka krwi, mogą oddziaływać z wieloma, często tymi samymi w przypadku obu układów, związkami biologicznie aktywnymi. Takie oddziaływania powodują powstawanie zmian w strukturze badanych układów, a dzięki zdolności do luminescencji, wykazywanej przez obie wspomniane grupy, można monitorować zachodzące oddziaływania dzięki wykorzystaniu metod spektroskopowych. Tak porfiryny, jak i białka mają tendencję do tworzenia niekwalencyjnych układów asocjacyjnych z innymi reagentami o odpowiedniej budowie.

Oddziaływania niekowalencyjne odgrywają znaczącą rolę zarówno podczas procesów biochemicznych zachodzących w układach biologicznych, jak i wielu procesów chemicznych i zjawisk fizykochemicznych. Mimo dużo mniejszej energii tych oddziaływań w porównaniu z energiami wiązań chemicznych, takie oddziaływania niekowalencyjne, jak wiązania hydrofobowe, jonowe, wodorowe, czy oddziaływania van der Waalsa okazują się niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmów żywych [26, 27].

Dużego znaczenia wspomnianych oddziaływań dowiodło wiele badań w dziedzinie nauk fizykochemicznych, biochemicznych, farmaceutycznych i medycznych, poświęconych niekowalencyjnym oddziaływaniom asocjacyjnym z udziałem substancji biologicznie aktywnych [28, 29]. Zapoznając się z literaturą odnoszącą się do tego zagadnienia nie natrafiłam jednak na analizę mechanizmu oddziaływań zachodzących pomiędzy badanymi przeze mnie wcześniej rozpuszczalnymi w wodzie porfirynami oraz ich kompleksami z wybranymi jonami metali, a dwupierścieniowymi związkami aromatycznymi. Mając na względzie olbrzymią wagę niekowalencyjnych oddziaływań asocjacyjnych związków biologicznie aktywnych, zarówno z porfirynami, jak i z białkami, analizę tych oddziaływań uznałam za niezwykle istotną, zarówno w aspekcie monitorowania i ochrony środowiska, jak i w aspekcie medycznym. Z tego względu w ramach cyklu prac habilitacyjnych podjęłam badania, których celem była charakterystyka mechanizmu niekowalencyjnych oddziaływań asocjacyjnych zachodzących pomiędzy wybranymi układami porfirynowymi lub białkami, a substancjami biologicznie aktywnymi, w aspekcie medycznym i ochrony środowiska. Realizacja tego celu obejmowała przeprowadzenie spektroskopowej analizy oddziaływań obserwowanych w układach substancja biologicznie aktywna – związek porfirynowy oraz substancja biologicznie aktywna – białko, a docelowo określenie mechanizmu oddziaływań oraz zmian zachodzących w konformacji białek, na podstawie obliczeń odpowiednich stałych i parametrów spektroskopowych, dzięki zastosowaniu procedury dopasowania (fitowania) uzyskanych danych oraz procedury wykorzystującej rachunek całkowity. Kolejnym celem przeprowadzonych przeze mnie badań było określenie wpływu pH środowiska reakcji, struktury związków porfirynowych i struktury związków biologicznie aktywnych na mechanizm oddziaływań niekowalencyjnych w badanych układach. Nadrzędnym celem badań opisanych w prezentowanej rozprawie habilitacyjnej było wykazanie użyteczności związków porfirynowych do monitorowania określonej klasy związków biologicznie aktywnych oraz wybranie najlepszego układu modelowego do tego typu badań.

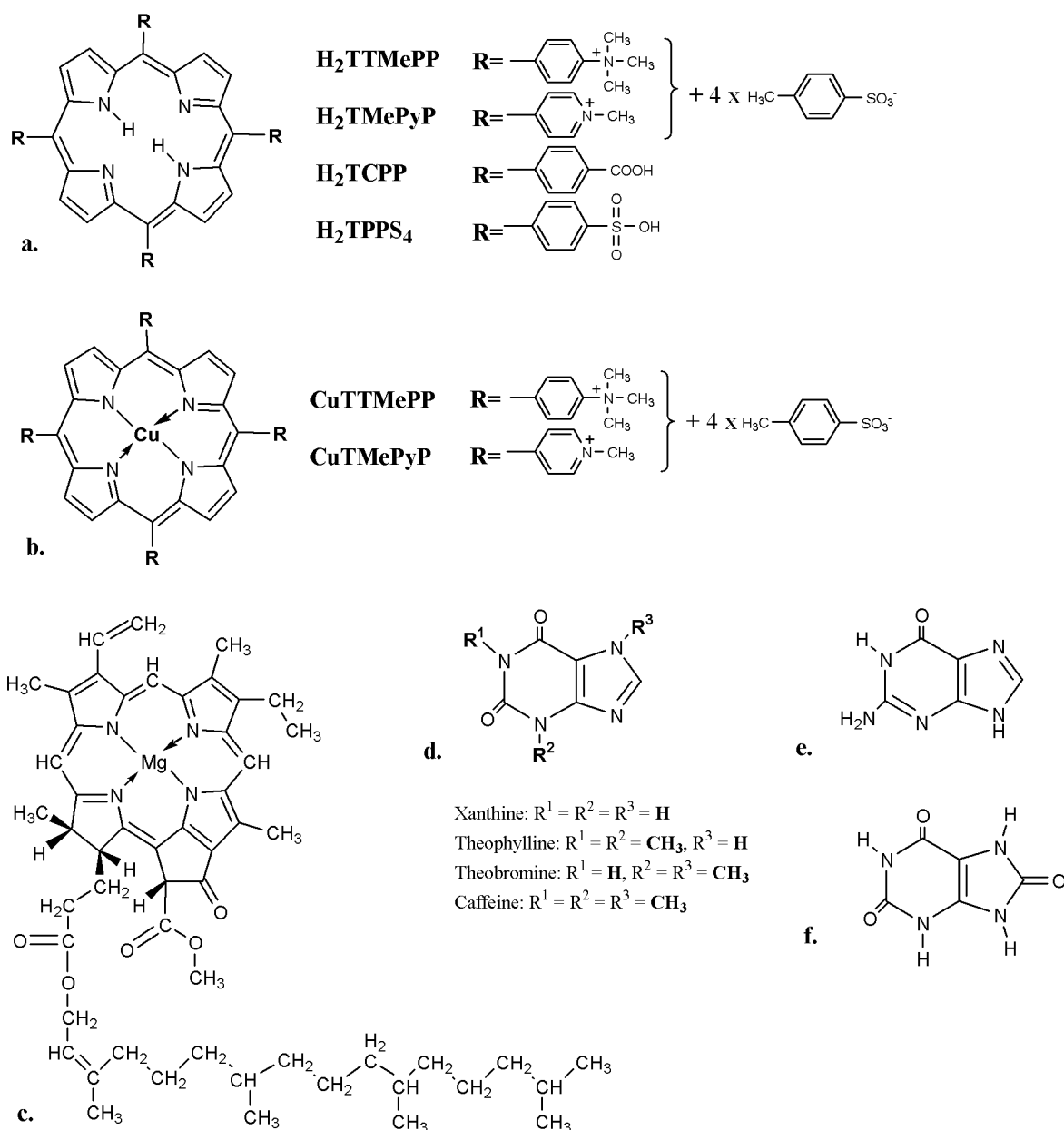
Omówienie najważniejszych wyników badań

Porfiryny to aromatyczne związki makrocykliczne o unikalnej budowie i właściwościach fizykochemicznych. Cząsteczka porfiryny złożona jest z czterech pierścieni pirolowych połączonych mostkami metinowymi, tworzących układ sprzężonych wiązań podwójnych, zawierających 18 zdelokalizowanych elektronów π , spełniających regułę aromatyczności Hückla ($4n + 2$, gdzie $n = 4$). Pierścienie pirolowe budują zamkniętą, aromatyczną płaszczyznę, stanowiącą jądro związku. Płaski pierścień porfiryny może ulegać deformacji m.in. podczas reakcji kompleksowania, protonowania, czy dimeryzacji, charakterystycznych dla tej klasy związków. Stopień rozpuszczalności w wodzie danego związku implikuje jego zachowanie podczas reakcji z innymi substancjami istotnymi dla organizmów żywych. Jak wiadomo, środowiskiem wewnętrznym organizmów żywych jest zazwyczaj środowisko wodne, dlatego to właśnie porfiryny rozpuszczalne w wodzie zasługują na szczególną uwagę, z racji ich roli w środowisku ożywionym oraz potencjalnej użyteczności dla człowieka. Porfiryny są z założenia związkami nie rozpuszczającymi się w wodzie. Rozpuszczalność tę można jednak uzyskać przez wprowadzenie do pierścienia porfirynowego odpowiednich podstawników, uzyskując związki rozpuszczalne w wodzie, które zachowują jednocześnie wszystkie właściwości przypisywane porfirynom nierozpuszczalnym i uczestniczą zarazem w takich samych reakcjach chemicznych. W zależności od charakteru chemicznego podstawnika można otrzymać porfiryny anionowe lub kationowe. Ciekawszym obiektem badawczym wydają się być porfiryny kationowe, szczególnie ze względu na ich oddziaływanie z białkami i podwójną helisą DNA [4]. Dlatego, aby dowieść, że porfiryny rozpuszczalne w wodzie, a zwłaszcza porfiryny kationowe, są zdolne do pełnienia roli substancji monitorujących obecność związków o znaczeniu biologicznym w środowisku wodnym, zdecydowałam się na wykonanie analizy mechanizmu niekowalencyjnych oddziaływań asocjacyjnych zachodzących pomiędzy wybranymi układami porfirynowymi, a dwupierścieniowymi związkami aromatycznymi [H1-H5]. Aby potwierdzić, że również porfiryny nierozpuszczalne w wodzie mogą spełniać funkcję czujników w odniesieniu do związków o znaczeniu biologicznym, przeanalizowałam mechanizm reakcji zachodzących w układzie porfiryna – związek biologicznie aktywny w środowisku niewodnym [H6]. Kolejnym etapem badań stała się analiza mechanizmu oddziaływań niekowalencyjnych zachodzących w układach substancja biologicznie aktywna – białko krwi, w przypadku których albo białko, albo wspomniana substancja zawierają w swojej strukturze charakterystyczny makrocykl porfirynowy [H7-H8]. Moim zamierzeniem

było potwierdzenie tezy, że badanie mechanizmu niekowalencyjnych oddziaływań asocjacyjnych w układach zawierających struktury porfiryne jest niezwykle istotne, zarówno w aspekcie ochrony środowiska, jak i w aspekcie medycznym.

Oddziaływania związków aktywnych biologicznie z porfirydami rozpuszczalnymi w wodzie

Jak wspomniałam wcześniej, substancje biologicznie aktywne, wchodzące m.in. w skład leków i różnego typu używek, stanowią nową grupę zanieczyszczeń, która wymaga monitorowania w środowisku wodnym przy użyciu związków o odpowiednich właściwościach, pozwalających na ich precyzyjne oznaczanie. Aby określić, w jaki sposób substancje o znaczeniu biologicznym mogą oddziaływać ze związkami, które mogłyby pełnić rolę potencjalnych czujników, zdecydowałam się scharakteryzować mechanizm oddziaływań jednego ze związków biologicznie aktywnych z grupą odpowiednio dobranych związków porfirydowych [H1]. Mój wybór padł na kofeinę, jeden ze związków należących do grupy metyloksantyn. Kofeina (1,3,7-trimetyloksantyna) to jedna z najpopularniejszych na świecie używek, przyjmowana przez ludzi nie tylko w formie leków czy środków odurzających, ale przede wszystkim jako składnik codziennie wypijanych popularnych napojów. We wszystkich wspomnianych używkach czy lekach kofeina występuje w postaci roztworów lub mieszanin wodnych. Kofeina spożywana w odpowiednich ilościach ma działanie prozdrowotne – oprócz pobudzenia organizmu wykazuje też właściwości przeciwnowotworowe [30]. Jednak spożywana w nadmiarze nie tylko powoduje zaburzenia w funkcjonowaniu układu krwionośnego, czy nerwowego, prowadząc do powstawania schorzenia zwanego *kafeinizmem* (zatrucia kofeiną) [31, 32], ale wydalana z moczem z organizmu stanowi kolejne źródło zanieczyszczeń, gdyż nie jest substancją ulegającą łatwej eliminacji ze ścieków [1]. Mimo że kofeina jest zazwyczaj dobrze metabolizowana przez organizm, w pobliżu dużych skupisk ludzkich jej zawartość w wodach lądowych i morskich stale rośnie. Udowodniono, że stężenie kofeiny w zbiornikach wodnych odpowiada zawartości bakterii występujących w ludzkich fekaliach, dlatego poziom kofeiny może być uważany za *antropogeniczny wskaźnik zanieczyszczeń* [33]. Wzrastająca ilość tego związku i jego metabolitów w zbiornikach wodnych może mieć niekorzystny wpływ na środowisko przyrodnicze, prowadząc do wcześniejszego starzenia się roślin lądowych [34], czy zaburzeń procesu fotosyntezy poprzez zmniejszanie aktywności chlorofilu [35]. Dlatego taka sytuacja stwarza potrzebę ciągłego monitorowania poziomu kofeiny w zbiornikach wodnych.

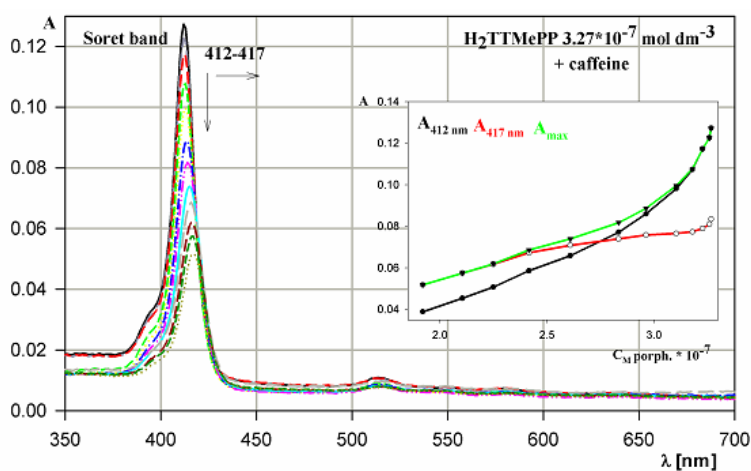


Rys. 1 Struktury cząsteczkowe reagentów stosowanych w prezentowanych w pracach [H1-H5] oddziaływaniach: a. związki porfiryne rozpuszczalne w wodzie, b. kompleksy porfiryne H₂TTMePP i H₂TMePyP z jonami Cu(II), c. *chlorofil a*, d. związki ksantynowe, e. guanina, f. kwas moczowy.

Do badania mechanizmu oddziaływania kofeiny wybrałam sześć związków porfirynowych rozpuszczalnych w wodzie: dwie porfiryne kationowe – porfiryne 5,10,15,20-tetrakis[4-(trimetyloamino)fenyłową] (H₂TTMePP) i porfiryne 5,10,15,20-tetrakis[4-(1-metylo-4-pirydyłową)] (H₂TMePyP), dwie porfiryne anionowe – porfiryne 5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatofenyłową) (H₂TPPS₄) i porfiryne 5,10,15,20-tetrakis(4-karboksyfenyłową) (H₂TCPP) oraz dwa związki kompleksowe porfiryne H₂TTMePP i H₂TMePyP z jonami Cu (II) – CuTTMePP i CuTMePyP. Dodatkowo zdecydowałam się na użycie *chlorofilu a*

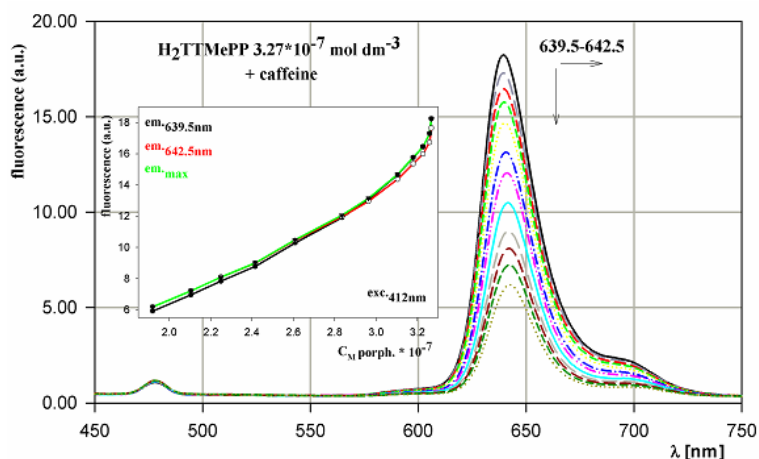
otrzymywanego z alg *Anacystis nidulans* (Rys. 1). Badane układy porfiryneowe dobrane były w sposób, który umożliwił porównanie różnych parametrów wpływających na charakterystykę spektralną każdej z porfiryn. Jak wiadomo, specyficzne właściwości spektroskopowe układów porfiryneowych, wynikające z ich budowy i charakterystyki fizykochemicznej oraz wysoki współczynnik absorpcji molowej implikują ich zdolność do intensywnej absorpcji i fluorescencji. Dlatego przemiany, którym ulegają porfiryny można monitorować przede wszystkim stosując metody spektrofotometryczne [36]. W skład widma absorpcji porfiryny wchodzi dwa pasma, widoczne w bliskim nadfiolecie i obszarze widzialnym, dzięki czemu związki te charakteryzują się intensywnymi kolorami. Pierwsze, bardziej intensywne pasmo Soreta (zwane też pasmem B), leży w zakresie 390–425 nm i tworzy się w wyniku dozwolonych przejść elektronowych z $\mu = \pm 3$ (HOMO) na $\mu = \pm 5$ (LUMO). W drugim, o wiele mniej intensywnym paśmie Q, położonym w zakresie 480–700 nm, które powstaje w rezultacie wzbronionych przejść elektronowych z $\mu = \pm 4$ (HOMO) na $\mu = \pm 5$ (LUMO), można wyróżnić od 2 do 4 składowych.

Analiza widm absorpcyjnych zarejestrowanych na spektrofotometrze JASCO V-660 podczas procedury miareczkowania poszczególnych roztworów związków porfiryneowych (wodnych lub acetonowego, w przypadku *chlorofilu a*) roztworem kofeiny wykazała, że w przypadku wszystkich badanych układów można zaobserwować przesunięcie maksimum absorpcji w widmie porfiryny w stronę fal o większej długości fali, zwane *przesunięciem batochromowym* oraz spadek intensywności maksimum pasma Soreta w widmie absorpcji, zwany *efektem hipochromowym* (Rys. 2).



Rys. 2 Zmiany zachodzące w widmie absorpcyjnym porfiryny H_2TMePP podczas miareczkowania roztworem kofeiny [H1].

Obserwowane efekty są dowodem na powstawanie nowej, zdolnej do absorpcji światła, formy badanego związku. Natomiast piki widoczne w widmach fluorescencji badanych układów, rejestrowanych na spektrofлуorymetrze UV-VIS-NIR QuantaMaster™ firmy Photon Technology International, na skutek oddziaływania z kofeiną uległy wygaszeniu (zmniejszyła się ich intensywność), a ich maksima – niewielkiemu przesunięciu (Rys. 3). Takie zjawisko, nazywane *zjawiskiem wygaszania fluorescencji*, może być podstawą badań dedykowanych substancjom, które mogłyby pełnić rolę czujników fluorescencyjnych.



Rys. 3 Zmiany zachodzące w widmie fluorescencji porfiryny $H_2TTMePP$ podczas miareczkowania roztworem kofeiny [**H1**].

Tego typu zmiany zachodzące w widmach absorpcji i fluorescencji wszystkich przebadanych układów wskazują według literatury na występowanie niekowalencyjnych oddziaływań asocjacyjnych w wyniku powstawania kompleksów asocjacyjnych [37-42]. Oddziaływania asocjacyjne, znane w literaturze angielskojęzycznej jako *π - π stacking interactions*, są jednym z typów oddziaływań niekowalencyjnych, zachodzących zazwyczaj w roztworach wodnych. Oddziaływania asocjacyjne są często utożsamiane z *procesem heteroasocjacji*, zachodzącym pomiędzy cząsteczkami przynajmniej dwóch różnych związków chemicznych [28]. Ideę oddziaływań asocjacyjnych opisuje teoria stworzona przez Hartmana i Shankela, zakładająca istnienie oddziaływań asocjacyjnych pomiędzy dwoma równoległymi lub bliskimi równoległymi płaskimi układami, *interceptorem* i *interkalatorem* (terminy te są zapożyczeniem z języka angielskiego – autorka nie znalazła bardziej adekwatnych polskich odpowiedników), znajdującymi się względem siebie w odpowiedniej geometrii, umożliwiającej wytworzenie oddziaływania najbardziej korzystnego energetycznie [43, 44]. Powstające układy asocjacyjne są na tyle trwałe, że mogą wpływać, przynajmniej czasowo, na

zmianę struktury cząsteczkowej biorących udział w tych oddziaływaniach związków makrocyclicznych.

Aby porównać moc oddziaływań zachodzących w badanych układach, oszacowałam parametry charakteryzujące zmiany zaobserwowane w widmach absorpcji i fluorescencji poszczególnych związków porfiryńowych – stałe asocjacji oraz stałe wygaszania fluorescencji. Stałe asocjacji K_{AC} układów powstających między porfirynami a kofeiną wyliczyłam wykorzystując równanie oparte na funkcji Bjerruma zmodyfikowanej przez Becka:

$$A = \frac{\varepsilon_0 + \varepsilon_1 K_{AC1} [U] + \varepsilon_2 K_{AC1} K_{AC2} [U]^2 + \dots + \varepsilon_n K_{AC1} K_{AC2} \dots K_{ACn} [U]^n}{1 + K_{AC1} [U] + K_{AC1} K_{AC2} [U]^2 + \dots + K_{AC1} K_{AC2} \dots K_{ACn} [U]^n} [P] \quad (1)$$

gdzie A oznacza wartość absorbancji, ε_0 to współczynnik absorpcji molowej dla wyjściowego roztworu porfiryny, ε_1 i K_{AC1} , ε_2 i K_{AC2}, \dots , itd. oznaczają odpowiednio kolejne współczynniki absorpcji molowej oraz cząstkowe stałe asocjacji dla powstających układów o stechiometrii 1:1, 1:2, ..., itd., natomiast $[U]$ i $[P]$ oznaczają stężenie kofeiny i porfiryny. Obliczenia wartości K_{AC} wykonałam biorąc pod uwagę zarówno model 1:1, jak i 1:2 powstających układów, dopasowując dane eksperymentalne za pomocą wyżej zaprezentowanego równania, przy użyciu nieliniowej procedury dopasowania opartej na algorytmie Marquardta-Levenberga (program SigmaPlot). Natomiast wartości stałej wygaszania fluorescencji K_{SV} wyliczyłam stosując klasyczne równanie Sterna-Volmera [45]:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q * \tau_0 = 1 + K_{SV} [Q] \quad (2)$$

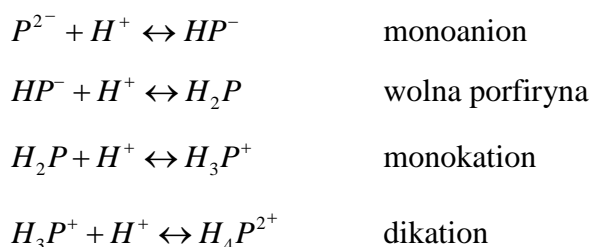
gdzie F_0 i F to wartości fluorescencji porfiryny odpowiednio bez oraz w obecności substancji wygaszającej (kofeiny), τ_0 oznacza średni czas życia porfiryny bez wygaszacza (w przypadku porfiryn rozpuszczalnych w wodzie τ_0 jest rzędu 10^{-9} s), k_q to bimolekularna stała wygaszania, $[Q]$ oznacza stężenie kofeiny, natomiast K_{SV} to stała wygaszania Sterna-Volmera. Wyliczone wartości stałych K_{AC} oraz K_{SV} , które dla wszystkich badanych układów były rzędu 10^3 - 10^4 [mol^{-1}], pozwoliły na potwierdzenie występowania statycznego mechanizmu wygaszania fluorescencji w analizowanych układach, wynikającego z tworzenia się asocjacyjnych kompleksów w stanie podstawowym pomiędzy związkami porfiryńowymi a kofeiną, która przyczyniła się do wygaszania fluorescencji porfiryn. Najsilniejsze oddziaływania zaobserwowałam w przypadku związków kompleksowych porfiryn

CuTTMePP i CuTMePyP, a także porfiryny H₂T CPP. Wysokie wartości stałych asocjacji otrzymałam też dla *chlorofilu a* oraz porfiryny H₂TTMePP. Siłę oddziaływań analizowałam biorąc pod uwagę wpływ jonów miedzi znajdujących się we wnętrzu porfirynej oraz różnice przestrzenne w budowie podstawników wchodzących w skład poszczególnych związków porfiryjnych. Analiza wyliczonych stałych wykazała, że najsilniejsze oddziaływania asocjacyjne zachodzą w przypadku miedziowych kompleksów porfiryjnych. Związki te nie wykazują jednak, ze względu na swoją budowę, właściwości fluorescencyjnych, co jest typowe dla związków kompleksowych porfiryjnych z jonami miedzi [46]. Natomiast w przypadku *chlorofilu a* wygaszanie fluorescencji wynika głównie z działania wody dodawanej podczas miareczkowania wodnym roztworem kofeiny. Dlatego najlepszym układem modelowym do prowadzenia analizy oddziaływań niekowalencyjnych okazała się porfiryjna H₂TTMePP, którą wybrałam do dalszych szczegółowych badań. Warto zaznaczyć, że forma cząsteczki tej porfiryjny w warunkach prowadzenia pomiarów (środowisko wodne o pH obojętnym) nie ulega zmianie. Związek ten uznałam więc za potencjalnie odpowiedni do roli wskaźnika stężenia kofeiny w środowisku wodnym.

Kontynuacją badań dotyczących niekowalencyjnych oddziaływań asocjacyjnych były tym razem próby wskazania związku biologicznie aktywnego o największej mocy oddziaływania, przedstawione w pracy [H2]. W tym celu przebadalam cztery układy porfiryjne: dwie kationowe porfiryjny rozpuszczalne w wodzie (H₂TTMePP, H₂TMePyP) i ich kompleksy z jonami miedzi (CuTTMePP, CuTMePyP) oraz pięć serii odczynników nukleinowych. Każda z serii złożona była z zasady nukleinowej (adeniny, guaniny, cytozyny, tyminy i uracylu) oraz odpowiadającego jej nukleozydu i nukleotydu. Ze względu na dużą ilość analizowanych układów zarejestrowałam jedynie widma absorpcji. Moc oddziaływań w powstających kompleksach asocjacyjnych analizowałam biorąc pod uwagę następujące czynniki: (i) typ związku porfiryjnego (porfiryjna lub kompleks z jonami Cu(II)), (ii) rodzaj grup pełniących rolę podstawników, (iii) rodzaj zasady nukleinowej (puryna lub pirymidyna), (iv) typ analizowanego odczynnika nukleinowego (zasada nukleinowa, nukleozyd, nukleotydy) oraz (v) pH środowiska reakcji. Wyliczone stałe asocjacji potwierdziły, że w badanych układach najsilniejsze oddziaływania występują w przypadku porfiryjny H₂TTMePP, co wiąże się z rodzajem i rozmiarem jej podstawników, biorących udział w tworzeniu układów asocjacyjnych. Siła oddziaływań rosła w większości przypadków w szeregu zasada nukleinowa < nukleozyd < nukleotydy. Natomiast najwyższą wartość stałej asocjacji

otrzymałam dla dwupierścieniowej cząsteczki guaniny, co było powodem wyboru tego związku do dalszych badań niekowalencyjnych oddziaływań asocjacyjnych.

Następnym krokiem była dokładna analiza oddziaływań asocjacyjnych w układzie $H_2TTMePP$ – guanina, zaprezentowana przeze mnie w pracy [H3]. Guanina (2-amino-6-hydroksypuryna) to jedna z zasad nukleinowych biorących udział w metabolizmie kwasów nukleinowych, związana z nadmierną produkcją kwasu moczowego, mogąca prowadzić do artretyzmu, dny moczanowej lub kamicy, bądź dodatek do kosmetyków [47]. Pomiar przeprowadziłam w środowisku zasadowym, ponieważ tylko w takich warunkach guanina ulega rozpuszczeniu. Odmienne środowisko reakcji stało się przyczyną zmian w mechanizmie zarejestrowanych we wspomnianym wyżej układzie oddziaływań. Warto zauważyć, że porfiryny rozpuszczalne w wodzie to związki amfiprotyczne – w zależności od pH środowiska mogą one występować w różnej formie. Przy pH 5-9 obserwuje się postać wolnej porfiryny H_2P , natomiast przy pH niższym lub wyższym, porfiryny przyłączając lub oddając jony H^+ w obrębie centralnych atomów azotu, przechodzą odpowiednio w formę kationową lub anionową, wg prezentowanych poniżej reakcji:



Protonowanie wolnej porfiryny prowadzi do zmian konformacji jej pierścienia, których rezultatem jest nachylenie pierścieni pirolowych oraz rotacja podstawników względem płaszczyzny makrocykla. Wykorzystując obrazy widm absorpcji UV-Vis, wyróżnić można najczęściej postać wolnej porfiryny H_2P oraz jej dikationu H_4P^{2+} . Rzadziej obserwuje się postać monoanionu HP^- , natomiast monokation (H_3P^+) i dianion (P^{2-}) występują tylko w wyjątkowych układach. Reakcje protonowania u tej grupy porfiryn powodują zauważalną zmianę barwy – z czerwonej na zieloną, wynikającą z przesunięcia maksimum pasma Soreta nawet o 40 nm. Biorąc pod uwagę powyższe informacje założyłam, że analizowane układy mogą zawierać więcej niż jedną formę fluorofora (porfiryny $H_2TTMePP$) o różnej dostępności w stosunku do wygaszacza (guaniny), dlatego otrzymane z pomiarów fluorescencji dane analizowałam nie tylko wg klasycznego równania Sterna-Volmera, ale również stosując jego zmodyfikowaną formę, zwaną równaniem Lehrera:

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{\alpha K_{SV}[Q]} + \frac{1}{\alpha} \quad (3)$$

gdzie α oznacza ułamek dostępnej dla wygaszacza populacji fluorofora. Oprócz stałych K_{AC} i K_{SV} oszacowałam też dla tego układu wydajność kwantową fluorescencji, stosując dwie procedury: (i) metodę porównawczą oraz (ii) sferę całkującą (K-Sphere'Petite, Photon Technology International Inc), w którą wyposażony jest spektrofluorymetr UV-VIS-NIR QuantaMaster™. W metodzie porównawczej do wyliczenia wydajności kwantowej badanych porfiryn wykorzystałam następującą zależność:

$$\Phi_S = \Phi_R \times \frac{F_S}{F_R} \times \frac{A_R}{A_S} \times \frac{n_S^2}{n_R^2} \quad (4)$$

gdzie F_S i F_R to powierzchnie odpowiednio widma fluorescencji badanego związku porfirynowego i odnośnika, A_S i A_R oznaczają wartość absorbancji przy maksimum pasma Soreta badanej porfiryny, natomiast n_S i n_R reprezentują indeksy refrakcji rozpuszczalników w przypadku badanej porfiryny i odnośnika (n_{wody} wynosi 1.3330 (20°C)), Φ_R to wartość wydajności kwantowej fluorescencji dla odnośnika. Jako odnośnik posłużyła mi porfiryne H₂TTMePP rozpuszczona w wodzie o pH obojętnym. Analizując wyliczone wartości stałych wygaszania fluorescencji zauważyłam, że w badanym układzie obserwuje się co prawda statyczny mechanizm wygaszania, ale porfiryne pełniąca rolę fluorofora jest tylko częściowo dostępna dla substancji wygaszającej, czyli guaniny. Takie zjawisko nazywane jest angielskim terminem *fractional accessibility*. W warunkach przeprowadzonego pomiaru (pH ok. 12.5) porfiryne występuje w postaci monoanionu HP⁻, dlatego to właśnie ta forma, a nie tzw. wolna porfiryne, bierze udział w oddziaływaniach z guaniną. Zauważyłam, że wyliczony na podstawie zarejestrowanych pomiarów czas życia anionowej formy porfiryny H₂TTMePP, równy w przybliżeniu 2 ns, jest krótszy niż czas życia formy H₂P, który wynosi 9.2 ns. Obie formy porfiryny, H₂P i HP⁻, wykazują zdolność do fluorescencji, ale przy różnych wartościach wydajności kwantowej. Wartość wydajności kwantowej wolnej porfiryny wynosi 0.125 i jest wyższa niż w przypadku monoanionu, a podczas oddziaływania z guaniną znacząco maleje. Otrzymane wyniki potwierdzają, że guanina może oddziaływać z anionową formą porfiryny H₂TTMePP w środowisku zasadowym i poprzez tworzenie z nią kompleksów asocjacyjnych jest zdolna do wygaszania fluorescencji monoanionu porfiryny. Takie rezultaty sugerują, że porfiryne H₂TTMePP może znaleźć zastosowanie w charakterze fluorescencyjnego czujnika do monitorowania związków o budowie podobnej do budowy

cząsteczki guaniny, co przy dużym obecnie zanieczyszczeniu lekami wód lądowych wydaje się obiecującą perspektywą.

Kolejnym etapem prowadzonych przeze mnie badań, opisanych w pracy [H4], stała się próba odpowiedzi na pytanie, w jaki sposób ewoluuje moc oddziaływań asocjacyjnych, gdy zmianie ulega ilość i położenie podstawników w cząsteczce związku należącego do metyloksantyn. Przedstawicielami tej grupy substancji, oprócz kofeiny, są teofilina (1,3-dimetyloksantyna), teobromina (3,7-dimetyloksantyna) i ksantyna (2,6-dihydroksypuryna), pochodzące głównie z naturalnych źródeł, takich jak liście herbaty, czy nasiona kawy i kakaowca, które wchodzi w skład wielu preparatów moczopędnych oraz rozszerzających naczynia oskrzeli i naczynia krwionośne, co wykorzystuje się do leczenia m.in. astmy oskrzelowej czy nadciśnienia [48, 49]. Wcześniejsze doniesienia wskazują, że związki należące do grupy metyloksantyn są zdolne do oddziaływania z wieloma substancjami organicznymi pełniącymi kluczowe funkcje w organizmie, takimi jak białka czy DNA, wykazując przy tym w stosunku do nich działanie ochronne [50-52]. Długotrwałe spożywanie produktów zawierających związki z grupy metyloksantyn może się również przyczynić do spowolnienia rozwoju dny moczanowej, schorzenia wynikającego z podwyższonego poziomu kwasu moczowego we krwi [53]. Na podstawie analizy niekwalencyjnych oddziaływań asocjacyjnych, prowadzonej według analogicznej procedury jak w pracy [H1], pomiędzy tą samą grupą sześciu porfiryn rozpuszczalnych w wodzie (H_2TMePP , $H_2TMePyP$, H_2TCPP , H_2TPPS_4 , $CuTMePP$, $CuTMePyP$), a teofiliną i teobrominą, których cząsteczki posiadają różnie rozmieszczone dwie grupy $-CH_3$, w przeciwieństwie do trzech grup $-CH_3$ w cząsteczce kofeiny, oraz ksantyną (nie zawierającą grup $-CH_3$) mogłam stwierdzić, że moc niekwalencyjnych oddziaływań asocjacyjnych w grupie metyloksantyn jest proporcjonalna do ilości grup $-CH_3$. Warto podkreślić, że wartości stałych asocjacji wyliczone przeze mnie dla wszystkich porfiryn oddziałujących z teofiliną były zawsze wyższe w porównaniu ze stałymi w układach porfiryne – teobromina, co jest wynikiem przeciwnym do rezultatów prezentowanych wcześniej w literaturze dla oddziaływań asocjacyjnych teofiliny i teobrominy z ludzką albuminą (HSA) [54]. Analizując zmiany zachodzące w widmach fluorescencji oraz wartości wyliczonych stałych K_{SV} dowiedziałam, że wygaszanie fluorescencji zachodzi w prezentowanych układach analogicznie jak w przypadku kofeiny wg statycznego mechanizmu wygaszania fluorescencji. Można też uznać, że w przypadku oddziaływań związków porfirynowych z metyloksantynami, tak jak i dla kofeiny, wartości K_{AC} oraz K_{SV} są następstwem unikalnej struktury i właściwości fizykochemicznych poszczególnych porfiryn. I

tym razem najsilniej oddziałującym z metyloksantynami związkami porfirynewymi okazała się porfiryna $H_2TTMePP$. Jednak, jak wskazują doniesienia literaturowe, sposób i moc oddziaływań w badanych układach zależą również od środowiska zachodzących reakcji [54]. Zarejestrowane w prezentowanych przeze mnie badaniach widma absorpcji i fluorescencji wskazują na to, że związki porfirynewe w warunkach prowadzenia procesu nie ulegają reakcjom protonowania, dlatego ich forma również nie ulega zmianie. Natomiast cząsteczki metyloksantyn istnieją w swojej formie podstawowej tylko w obojętnym lub słabo zasadowym środowisku, podczas gdy przy wyższych wartościach pH mogą być do pewnego stopnia naładowane ujemnie [48], co mogłoby tłumaczyć otrzymane przeze mnie wyniki wskazujące na słabsze oddziaływania zachodzące pomiędzy teobrominą i ksantyną (rozpuszczalnymi w roztworach zasadowych), a porfirydami anionowymi.

Jako że nieprawidłowy metabolizm guaniny może się wiązać z nadmierną produkcją kwasu moczowego w organizmie człowieka, zdecydowałam, że następnym analizowanym układem będzie układ porfiryna $H_2TTMePP$ – kwas moczowy, przedstawiony w pracy [H5]. Kwas moczowy (2,6,8-trihydroksypuryna), końcowy produkt katabolizmu nukleozydów purynowych w organizmie człowieka, pełni rolę wskaźnika wielu chorób związanych z nieprawidłowym poziomem moczanów w moczu i we krwi, takich jak kamica, dna moczanowa, białaczka, choroby nerek i układu krążenia. Jako że fizjologiczny poziom kwasu moczowego u zdrowych ludzi waha się we krwi w zakresie 120-450 μM , podczas gdy w przypadkach patologicznych wzrasta nawet do 500 μM [55, 56], dlatego szybkie i dokładne oznaczanie poziomu tego kwasu w organizmie jest niezbędne do prawidłowej diagnozy wielu chorób [57]. Podobnie jak guanina, kwas moczowy rozpuszcza się w środowisku zasadowym, co sugerowałoby podobny mechanizm zachodzących oddziaływań. Rzeczywiście, wyliczone przeze mnie stałe asocjacji i wygaszania fluorescencji wskazują na istnienie statycznego mechanizmu wygaszania, i tak jak w przypadku guaniny, częściowej dostępności porfiryny dla wygaszającego działania kwasu moczowego, co spowodowane jest występowaniem różnych form porfiryny w badanym środowisku reakcji. Należy jednak zauważyć, że kwas moczowy jest kwasem diprotycznym, zdolnym do występowania zarówno w postaci jonowej, jak i w formie soli. Odmiennie niż w przypadku większości kwasów organicznych, związek ten ulega procesowi deprotonowania przy atomie azotu, co prowadzi może do tworzenia wiązania wodorowego lub oddziaływań elektrostatycznych z reagującymi z nim substancjami [57]. W związku z tym prześledziłam mechanizm oddziaływań porfiryny zarówno z kwasem moczowym, jak i jego solą sodową. Mechanizm tych oddziaływań okazał się porównywalny,

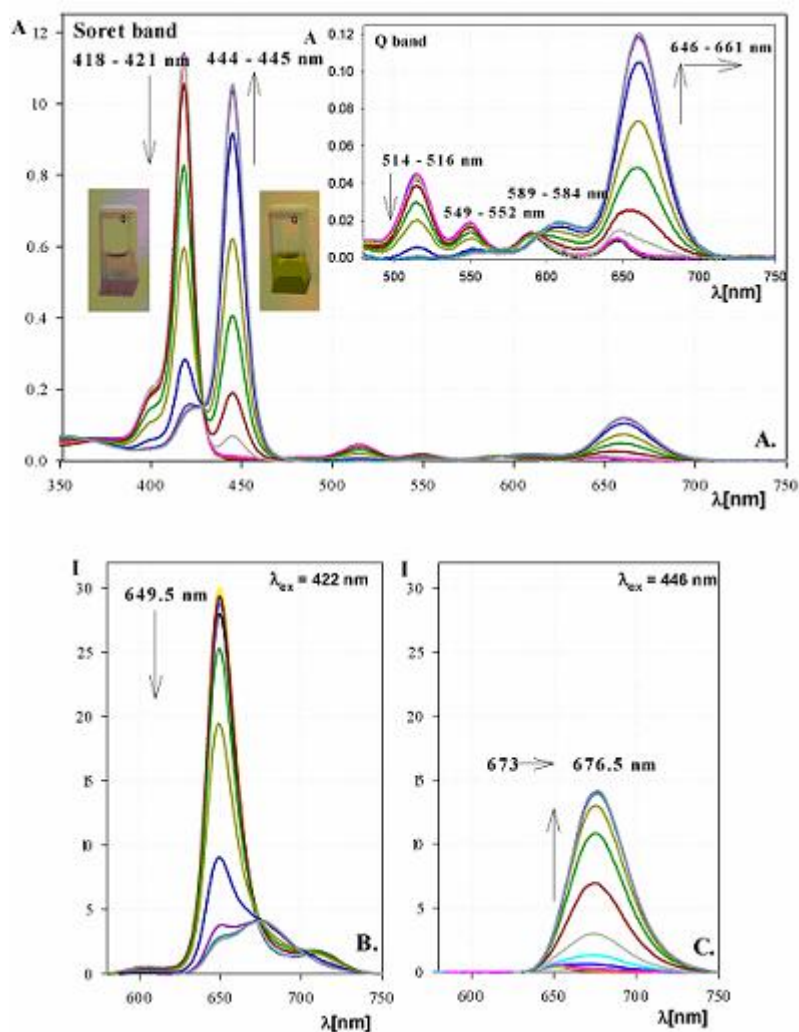
choć zachowanie porfiryny $H_2TTMePP$ w obu przypadkach było nieco odmienne. Podczas analizy oddziaływania porfiryny z kwasem moczowym zaobserwowałam, że kwas ten wygasza fluorescencję głównie postaci tzw. wolnej porfiryny (H_2P), co potwierdza fakt, że porfiryne $H_2TTMePP$ w obecności kwasu moczowego nie ulega procesowi protonowania, mimo zasadowego środowiska reakcji. Natomiast sól sodowa kwasu moczowego wygasza fluorescencję zarówno wolnej porfiryny, jak i jej formy anionowej, potwierdzając, że w takim układzie można obserwować początek procesu zmiany formy cząsteczki porfiryny. Takie wyniki wskazują na to, że powstawanie kompleksów asocjacyjnych działa inhibującą na procesy deprotonowania, którym ulega cząsteczka porfiryny w środowisku zasadowym. Wskazuje to na silniejszą naturę procesów asocjacyjnych w porównaniu z oddziaływaniem cząsteczki porfiryny z jonami wodorotlenowymi.

Zamieszczone w pracy obliczenia kwantowo-mechaniczne pozwoliły odpowiedzieć na pytanie, przy jakiej stechiometrii tworzą się omawiane kompleksy. Modelowanie procesów asocjacji porfiryny i kwasu moczowego wskazuje na powstawanie zarówno kompleksów o stechiometrii 1:1, jak i o stechiometrii 1:2, choć trudno określić, która forma przeważa w badanym roztworze. Uważam, że otrzymane wyniki dotyczące układu porfiryne $H_2TTMePP$ – kwas moczowy mają potencjalnie duże znaczenie medyczne, pozwalając na wgląd w farmakologię kwasu moczowego, zwłaszcza w przypadku chorób związanych z jego nadmierną produkcją w organizmie człowieka.

Oddziaływania związków aktywnych biologicznie z porfirydami nierozpuszczalnymi w wodzie

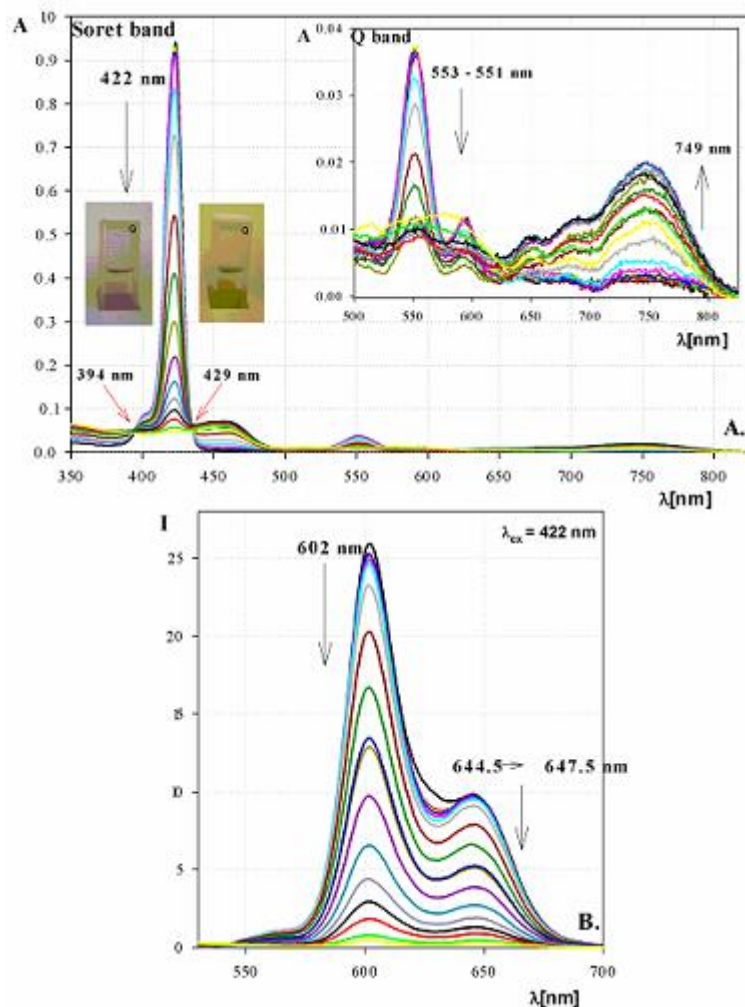
Dla porównania z układami porfirydnymi rozpuszczalnymi w wodzie, przeprowadziłam również analizę oddziaływań pomiędzy związkami porfirydnymi rozpuszczalnymi w rozpuszczalnikach organicznych oraz β -myrcenem, jednym ze związków o znaczeniu biologicznym, który również nie ulega rozpuszczaniu w roztworach wodnych [H6]. Użycie β -myrcenu (7-metylo-3-metyleno-1,6-oktadienu), jedyne go z analizowanych związków, który nie należy do dwupierścieniowych związków aromatycznych, zostało podyktowane chęcią sprawdzenia, czy również porfiryne nierozpuszczalne w wodzie mogłyby znaleźć potencjalne zastosowanie jako czujniki służące do wykrywania substancji biologicznie aktywnych. Nie ulegający rozpuszczaniu w wodzie β -myrcen to naturalny

związek, stosowany głównie w przemyśle perfumeryjnym lub jako substrat podczas przemysłowego otrzymywania olejków zapachowych [58, 59]. Jego właściwości antyseptyczne, czy antybakteryjne są od dawna wykorzystywane w leczeniu [60]. Badania przeprowadziłam z wykorzystaniem dwóch nierozpuszczalnych w wodzie porfiryn – porfiryny 5,10,15,20-tetrafenylowej (H_2TPP) oraz porfiryny 5,10,15,20-tetra(4-pirydyłowej) (H_2TPyP), a także związków kompleksowych porfiryn H_2TPP i H_2TPyP z jonami $Zn(II)$ – $ZnTPP$ i $ZnTPyP$. Przeprowadzona procedura miareczkowania chloroformowych roztworów porfiryn roztworem β -myrcenu nie przyniosła, tak jak wstępnie zakładałam, żadnego rezultatu, potwierdzając fakt, że niekowalencyjne oddziaływania asocjacyjne mogą występować jedynie w roztworach wodnych [28]. Kolejnym etapem badań stało się naświetlanie chloroformowych roztworów poszczególnych porfiryn światłem widzialnym, czyli zastosowanie odmiennej od zaprezentowanych wcześniej metody oddziaływania na strukturę makrocykla porfirynowego. W tym wypadku również nie uzyskałam żadnych znaczących efektów. Dopiero naświetlanie roztworów porfiryn w obecności β -myrcenu przyniosło pożądane wyniki. Naświetlanie wszystkich czterech układów porfirynowych (H_2TPP , H_2TPyP , $ZnTPP$ i $ZnTPyP$) światłem widzialnym w obecności β -myrcenu doprowadziło do wygaszenia intensywności pików widocznych zarówno w ich widmach absorpcji, jak i fluorescencji, przy jednoczesnej bardzo wyraźnej zmianie barwy naświetlanych roztworów porfiryn. W przypadku porfiryn H_2TPP i H_2TPyP zaobserwowałam również powstawanie drugiego pików absorpcji, a także wyraźnego *punktu izozbestycznego*, co świadczy niezaprzeczalnie o przekształcaniu się jednej formy porfiryny w drugą (Rys. 4). W analizowanym przypadku tzw. wolne formy porfiryn uległy pod wpływem naświetlania przekształceniu w formy dikationu H_4P^{2+} , co jest procesem charakterystycznym przede wszystkim dla reakcji protonowania porfiryn w środowisku o $pH < 7$. Ewidentna zmiana barwy porfiryny z różowej na zieloną potwierdziła, że powstającą w obserwowanej reakcji formą porfiryny jest dikation. Widma fluorescencji, rejestrowane przy dwóch wartościach długości fali wzbudzenia, również wskazują na tworzenie się dikationu.



Rys. 4 Zmiany zachodzące w widmie absorpcji (A) i fluorescencji (B, C) porfiryny H₂TPP podczas naświetlania jej chloroformowego roztworu światłem widzialnym w obecności β-myrceju [H6].

Natomiast zmiany zachodzące w widmach absorpcji i fluorescencji podczas naświetlania światłem widzialnym związków kompleksowych porfiryn, ZnTPP i ZnTPyP, wskazują na odmienny mechanizm obserwowanych przemian (Rys. 5). W tym wypadku nie można stwierdzić powstawania innej formy związku porfirynowego, ale obserwowane zmiany, zwłaszcza w paśmie Q, sugerują powstawanie zagregowanych układów porfirynowych, które nie wykazują zdolności do fluorescencji.



Rys.5 Zmiany zachodzące w widmie absorpcji (A) i fluorescencji (B) związku ZnTPP podczas naświetlania jego chloroformowego roztworu światłem widzialnym w obecności β -myrcenu [H6].

Wykorzystując uzyskane dane spektroskopowe udowodniłam, że β -myrcen przyspiesza fotodegradację chloroformu narażonego na działanie światła oraz powstającego podczas naświetlania tlenu singletowego, ułatwiając jednocześnie powstawanie chlorowodoru (H^+Cl^-), niezbędnego w procesach protonowania i dimeryzacji układów porfiryńowych. Naświetlanie obu porfiryń, H_2TPP i H_2TPyP , doprowadziło do przekształcenia wolnych porfiryń w formy dikationów, H_4P^{2+} , w wyniku ich oddziaływania z jonami H^+ . Natomiast naświetlanie cynkowych kompleksów porfiryń, ZnTPP i ZnTPyP , doprowadziło do ich agregacji z jonami Cl^- , odgrywającymi w powstających agregatach rolę mostków pomiędzy płaszczyznami cząsteczek porfiryń. Warto zauważyć, że to właśnie obecność β -myrcenu umożliwiła zmianę formy związków porfiryńowych na skutek działania światła widzialnego. Do tej pory takie zmiany obserwowano jedynie w przypadku naświetlania roztworów porfiryń światłem UV [61-63]. Największe zmiany właściwości spektroskopowych, implikujące widoczną „gołym

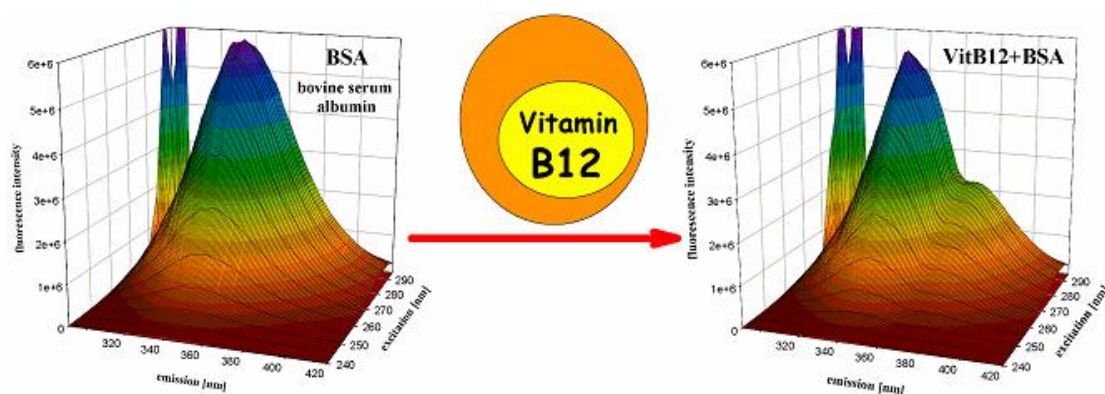
okiem” zmianę barwy, zaobserwowałam w układzie zawierającym β -myrcen i porfiryne ZnTPP. Uważam, że przeprowadzone pomiary, mimo że nie potwierdziły istnienia niekwalencyjnych oddziaływań asocjacyjnych w badanych układach, mogą być z powodzeniem wykorzystane do stworzenia nowoczesnych materiałów, wrażliwych na działanie światła widzialnego, co wpisuje się w tematykę badań dotyczących porfiryńowych czujników fluorescencyjnych.

Oddziaływania związków aktywnych biologicznie z białkami układu krwionośnego

Badanie wzajemnych oddziaływań pomiędzy elementami układu krwionośnego (białkami), a biologicznie aktywnymi substancjami o właściwościach leczniczych (lub toksycznych) stało się ostatnio popularnym tematem wielu publikacji naukowych [64-69]. Analiza właściwości fizykochemicznych oraz zmian zachodzących w konformacji białek na skutek oddziaływania z substancjami o znaczeniu biologicznym uważana jest obecnie za podstawę chemii medycznej, biochemii, medycyny klinicznej oraz nauki o żywności. Dlatego postanowiłam sprawdzić, w jaki sposób substancje o znaczeniu biologicznym mogą oddziaływać z jednym z najważniejszych białek układu krwionośnego człowieka, hemoglobina, która w swojej strukturze zawiera cztery cząsteczki hemu – związki porfiryńowe z jonami żelaza. Do realizacji tych badań, opisanych w pracy [H7], wybrałam kwas moczowy, kierując się chęcią poznania mechanizmu niewątpliwie niekorzystnego oddziaływania nadmiernych ilości tego kwasu na konformację hemoglobiny i jej funkcje fizjologiczne. Chciałabym podkreślić, że przeprowadzone przeze mnie badanie oddziaływań kwasu moczowego z hemoglobina ludzką zostało przedstawione w literaturze po raz pierwszy. Dla porównania przeprowadziłam też badanie oddziaływań pomiędzy innym białkiem układu krwionośnego, albumina wołową (strukturalnie analogiczną z albumina ludzką), która nie zawiera w swojej strukturze układów porfiryńowych, a nadmiarem innego związku o znaczeniu biologicznym, cyjanokobalaminy, zwanej też witamina B₁₂. Wspomniana witamina jest układem porfiryńowym zawierającym w swojej cząsteczce, jak wskazuje jej nazwa, jony kobaltu. Doniesienia literaturowe szeroko komentują skutki niedoboru tej witaminy na funkcjonowanie organizmu człowieka, natomiast sporadycznie spotkać można publikacje dotyczące wpływu nadmiaru tego związku [70-72]. Badanie oddziaływania w układzie albumina – witamina B₁₂ opisałam w pracy [H8]. Mimo że w układzie hemoglobina – kwas moczowy struktury porfiryńowe znajdują się w cząsteczce

białka, natomiast w układzie albumina – cyjanokobalamina związkami porfiryńnymi jest substancja biologicznie aktywna, mechanizm oddziaływań w prezentowanych układach okazał się podobny, dlatego wyniki uzyskane podczas analizy oddziaływań w obu wspomnianych układach postanowiłam omówić razem. Warto pamiętać, że albumina wołowa (BSA) i ludzka (HSA), a przede wszystkim hemoglobina ludzka (HHb), to białka będące jednymi z najważniejszych składników układu krwionośnego, ze względu na ich zaangażowanie w różne procesy metaboliczne. Oprócz tego oba te białka uczestniczą również w przenoszeniu różnych endo- i egzogennych substancji organicznych, wywierających niewątpliwie wpływ na najważniejsze procesy fizjologiczne przebiegające w organizmie zwierząt i ludzi [73-75]. Substancje te transportowane są przez białka dzięki procesowi tworzenia *odwracalnych niekowalencyjnych połączeń* z odpowiednimi elementami strukturalnymi białek, określanemu jako oddziaływanie asocjacyjne π - π lub oddziaływanie wiążące [76]. Powstawanie odwracalnych niekowalencyjnych połączeń pomiędzy białkami krwi (przede wszystkim albuminami), a różnymi lekami i innymi substancjami aktywnymi biologicznie możliwe jest dzięki specyficznej elastycznej strukturze cząsteczek białek, która pozwala im na przystosowanie się do różnych ligandów [77]. Unikalna konformacja każdego białka w roztworze wodnym zależy głównie od powstających wiązań wodorowych oraz oddziaływań elektrostatycznych, van der Waalsa, czy hydrofobowych, zachodzących pomiędzy resztami aminokwasowymi. Z tego powodu polarne grupy aminokwasowe, które znajdują się na powierzchni białek, są narażone na działanie środowiska wodnego, podczas gdy grupy niepolarne znajdują się we wnętrzu struktury białka, co chroni je przed destabilizującym działaniem rozpuszczalnika [78]. Warto zauważyć, że jakakolwiek zmiana w obrębie struktury białka świadczy potencjalnie o zakłóceniu jego funkcji fizjologicznych.

Analizę oddziaływań asocjacyjnych zachodzących w układach HHb – kwas moczowy [H7] oraz BSA – witamina B₁₂ [H8] przeprowadziłam rejestrując zmiany zachodzące podczas miareczkowania odpowiednimi titrantami (kwas moczowy, witamina B₁₂) roztworów białek (hemoglobiny i albuminy), przygotowanych w odpowiednim roztworze buforowym o pH odpowiadającym pH fizjologicznemu (bufor TRIS o pH = 7.4). Zachodzące zmiany rejestrowałam nie tylko w widmach absorpcji UV-Vis i widmach fluorescencji, ale też w synchronicznych widmach fluorescencji oraz trójwymiarowych widmach fluorescencji wymienionych białek (Rys. 6).



Rys. 6 Zmiany obserwowane w trójwymiarowym widmie fluorescencji BSA podczas oddziaływania z witaminą B₁₂ [H8].

Warto zwrócić uwagę, że oddziaływania asocjacyjne zachodzące w układzie substancja biologicznie aktywna – białko, prowadząc do zmiany konformacji białek mogą mieć wpływ, zazwyczaj niekorzystny, na ich funkcje fizjologiczne, co może prowadzić, w zależności od oddziałującej substancji, do istotnych konsekwencji. Zmiany konformacji biorących udział w tych oddziaływaniach białek można określić za pomocą pomiarów ich widm absorpcji i fluorescencji. W przypadku obu analizowanych układów zaobserwowałam *przesunięcie batochromowe i hipochromowe* maksimum pasma w widmie absorpcji charakterystycznym dla białek i położonym przy 273 nm. Natomiast pik Soreta przy 406 nm, odzwierciedlający obecność układów hemowych (tylko w strukturze hemoglobiny), ulegał spadkowi, bez przesunięcia maksimum. Zaprezentowane zmiany zachodzące w widmie absorpcji analizowanych układów są potwierdzeniem obecności niekwalencyjnego oddziaływania asocjacyjnego π - π pomiędzy obydwoma białkami, a kwasem moczowym, bądź witaminą B₁₂. Jako że zarówno białka, jak i oba titrany zawierają w swoich cząsteczkach struktury aromatyczne, w myśl hipotezy dotyczącej oddziaływań w układzie *interceptor-interkalator* mamy tu do czynienia z oddziaływaniem wiążącym (asocjacyjnym) na skutek tworzenia się kompleksu w stanie podstawowym. Mimo że kwas moczowy może oddziaływać ze związkami porfirynewymi [H5], w tym wypadku jego cząsteczki wiążą się jedynie ze strukturami białkowymi hemoglobiny, a nie z hемом położonym we wnętrzu tego białka. Wyliczyłam również wartości stałych trwałości oraz liczbę miejsc wiążących, określającą stechiometrię powstających układów. Stałe trwałości wyliczone dla obu badanych układów są rzędu 10⁴. Liczba miejsc wiążących w przypadku obu badanych układów zbliżona jest do jedności, co potwierdza oddziaływanie białka i badanych substancji aktywnych biologicznie w stosunku molowym 1:1, wskazując na istnienie tylko jednego miejsca wiążącego w

strukturze obu białek. W badanych układach zaobserwowałam też wyraźny spadek intensywności fluorescencji. Aby zweryfikować mechanizm wygaszania fluorescencji białek, otrzymane dane analizowałam początkowo w oparciu o klasyczne równanie Sterna-Volmera, a następnie o jego zmodyfikowaną formę, zwaną równaniem Lehrera. Wyliczone stałe wygaszania fluorescencji odpowiadają wartościom stałych asocjacji (trwałości). Takie wartości wspomnianych parametrów potwierdzają istnienie oddziaływań wiążących w badanych układach, sugerując jednocześnie, że przedstawiony proces wygaszania fluorescencji zachodzi wg statycznego mechanizmu wygaszania, opartego na powstawaniu kompleksów asocjacyjnych w stanie podstawowym.

Jedną z bardzo przydatnych technik w analizie konformacyjnej białek i ich oddziaływań wiążących z innymi związkami jest wyliczenie parametrów FRET (Förster Resonance Energy Transfer) [79]. Wg Förstera, odległość r pomiędzy donorem a akceptorem mniejsza niż 7 nm świadczy o możliwości przeniesienia energii w badanym układzie pomiędzy białkiem, a substancją z nim oddziałującą. Parametr E , oznaczający efektywność przeniesienia energii, pozwala natomiast na określenie odległości pomiędzy wchodzącym w skład białka tryptofanem, biorącym udział w oddziaływaniu, a miejscem wiążącym oddziałującej z nim substancji. Dlatego opierając się na teorii Förstera i zamieszczonych niżej równaniach obliczyłam wartość parametru E dla obu rozpatrywanych układów [45]:

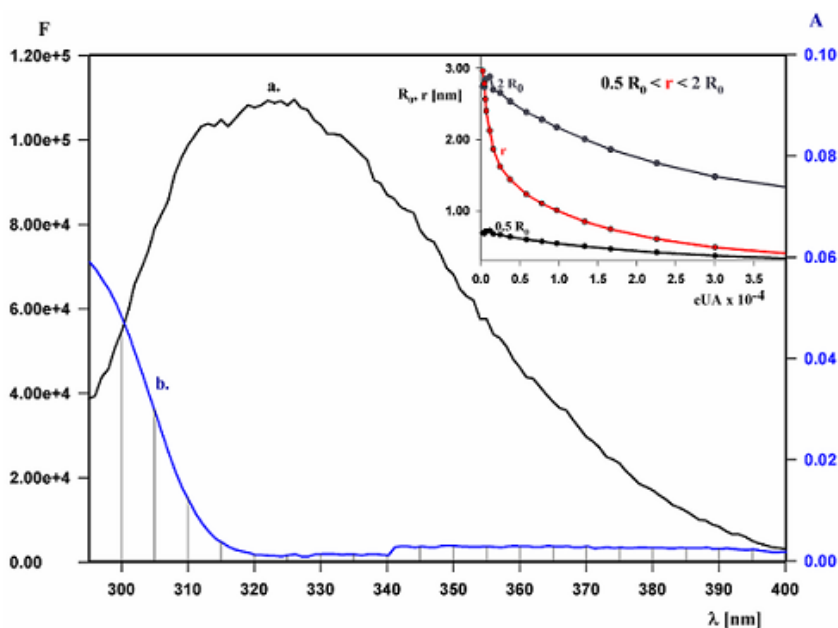
$$E = 1 - \frac{F}{F_0} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (5)$$

$$R_0^6 = 8.79 \cdot 10^{-25} K^2 N^{-4} J \varphi \quad (6)$$

$$J = \frac{\int_0^{\infty} F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int_0^{\infty} F(\lambda) d\lambda} \quad (7)$$

gdzie r oznacza odległość między donorem a akceptorem, R_0 to krytyczna odległość Förstera, przy której 50% energii wzbudzenia przenoszone jest do akceptora, K^2 oznacza czynnik orientacji przestrzennej dipola (w badanych układach $K^2 = 2/3$ dla przypadkowej orientacji, tak jak w roztworach ciekłych), N to średni indeks refrakcji środowiska reakcji (w tym przypadku $N = 1.336$), φ to wydajność kwantowa fluorescencji donora (w przypadku HHb $\varphi = 0.06$, w przypadku BSA $\varphi = 0.15$), J to efekt nakładania się widm emisji donora oraz absorpcji akceptora, $F(\lambda)$ oznacza skorygowane wartości intensywności fluorescencji donora w zakresie długości fali od λ do $\lambda + \Delta\lambda$, $\varepsilon(\lambda)$ to współczynnik absorpcji molowej akceptora przy λ . W prezentowanych pomiarach rolę donora pełniła cząsteczka białka, natomiast rolę

akceptora cząsteczka kwasu moczowego lub witaminy B₁₂. Wszystkie parametry (J , E , R_0 i r) wyliczyłam dla tego samego stężenia białka i substancji aktywnej biologicznie, w obu analizowanych układach (Rys. 7). Wyliczone parametry FRET wskazują, że dla obu badanych układów odległość $r < 7$ nm i mieści się w zakresie $0.5 R_0 < r < 2.0 R_0$, co wg teorii Förstera bezsprzecznie potwierdza możliwość przeniesienia energii między białkiem a substancją z nim oddziałującą, wskazując równocześnie kolejny raz na istnienie w przedstawionych układach statycznego mechanizmu wygaszania fluorescencji [45].



Rys. 7 Obraz nakładania się widma fluorescencji HHb (a) i widma absorpcji kwasu moczowego (b). Wewnętrzny rysunek przedstawia zależność odległości r pomiędzy donorem a akceptorem od krytycznej odległości Förstera R_0 w funkcji wzrastającego stężenia kwasu moczowego [H7].

Dzięki obecności reszt aminokwasowych fenyloalaniny, tyrozyny, a zwłaszcza tryptofanu, które dzięki swojej budowie chemicznej wykazują zdolność do fluorescencji, można obserwować kierunek i intensywność zmian zachodzących w strukturze białek, w czym pomocne są przede wszystkim pomiary synchroniczne ich widm fluorescencji. Dlatego przeprowadziłam badanie zmian konformacyjnych białek, zachodzących podczas odwracalnego wiązania się z ich strukturą kwasu moczowego lub witaminy B₁₂, na podstawie analizy ich synchronicznych widm fluorescencyjnych, pozwalających na jednoczesny skanowanie w zakresie długości fali wzbudzenia i emisji, przy stałym odstępnie między nimi. Ustalając wartość $\Delta\lambda$ (między długością fali wzbudzenia i emisji) jako $\Delta\lambda = 15$ lub $\Delta\lambda = 60$ nm, można otrzymać dane dotyczące zmian polarności środowiska reakcji wokół odpowiednio tyrozyny lub tryptofanu, wchodzących w skład cząsteczki białka. Tego typu zmiany informują o

udziale odpowiednich reszt aminokwasowych białka w oddziaływaniach wiążących z innymi substancjami [80]. Przesunięcie maksimum pików w kierunku podczerwieni wskazuje na wzrost polarności środowiska wokół reszt danego aminokwasu. Z kolei przesunięcie maksimum pików w kierunku nadfioletu świadczy o spadku polarności środowiska. Zmiana polarności środowiska wokół tyrozyny czy tryptofanu, odpowiedzialnych za stabilizację czwartorzędowej struktury białka, prowadzić może do destabilizacji konformacji białkowej [81]. W przypadku układu HHb – kwas moczowy zaobserwowałam bardzo silne oddziaływania wokół obu rozpatrywanych reszt aminokwasowych: polarność wokół tyrozyny wzrosła, natomiast wokół tryptofanu zmalała, wskazując na zmiany ich usytuowania w strukturze hemoglobiny. Natomiast w przypadku układu BSA – witamina B₁₂ w środowisku lokalnym wokół reszt tyrozyny nie doszło do zmian polarności, w przeciwieństwie do otoczenia reszt tryptofanu, wokół których zaobserwowałam spadek polarności, wskazujący jednocześnie na wzrost hydrofobowości lokalnego środowiska zachodzącego oddziaływania. Jak już wspomniałam wcześniej, wewnątrz struktury białka ma naturę hydrofobową, natomiast jego powierzchnia zawiera grupy polarne, pozwalające na oddziaływanie z wodnym środowiskiem otaczającym jego strukturę, dlatego wzrost polarności wokół odpowiednich reszt aminokwasowych można interpretować jako ich przesunięcie w kierunku powierzchni białka, natomiast spadek polarności – jako przesunięcie w kierunku środka struktury białkowej. Potwierdzenie zmian konformacyjnych w cząsteczce białka jest jednocześnie kolejnym dowodem na występowanie statycznego mechanizmu wygaszania fluorescencji, polegającego na powstawaniu kompleksów asocjacyjnych. Zmiany strukturalne powstające na skutek oddziaływań niekowalencyjnych zachodzących z udziałem białek można analizować za pomocą pomiarów wygaszania ich fluorescencji, ponieważ cząsteczka BSA posiada dwie grupy tryptofanowe (Trp) odpowiedzialne za naturalną (wewnętrzną) fluorescencję białek – Trp-212 należący do subdomeny IIA, usytuowany wewnątrz kieszeni hydrofobowej, oraz Trp-134 przypisany do subdomeny IB i położony na powierzchni cząsteczki albuminy [82, 83]. Natomiast tetrameryczna cząsteczka hemoglobiny zawiera w swojej strukturze sześć grup tryptofanowych i dwanaście grup tyrozynowych (Tyr), z czego trzy Trp i 6 Tyr w każdym dimerze oznaczonym jako $\alpha\beta$. Wśród reszt tryptofanowych jedynie β -37Trp, położony na powierzchni międzyfazowej pomiędzy dwoma dimerami, w hydrofobowym środowisku wewnątrz hemoglobiny, jest odpowiedzialny za fluorescencję HHb [84-86]. To oznacza, że miejsce wiążące dla cząsteczek związków aktywnych biologicznie znajduje się w przypadku hemoglobiny w sąsiedztwie wspomnianej reszty tryptofanowej. Można więc wnioskować, że

intensywność i położenie piku fluorescencji HHb odzwierciedla polarność lokalnego środowiska chromoforowych grup białka, pozwalając jednocześnie na przewidywanie mechanizmu oddziaływań białek ze związkami aktywnymi biologicznie [87]. Z tego względu badanie wzajemnych oddziaływań pomiędzy białkami, a substancjami aktywnymi biologicznie o właściwościach leczniczych (lub toksycznych) przy zastosowaniu metod spektroskopowych, w sytuacji, gdy cząsteczka białka lub cząsteczka oddziałującej z nim substancji aktywnej biologicznie posiadają w swej strukturze pierścienie porfirynowe, może być podstawą dla rozwoju nowoczesnej chemii medycznej, farmacji, biochemii, medycyny klinicznej oraz nauki o żywności. Uważam, że przedstawione w pracach [H7-H8] badania, dotyczące oddziaływania białek z nadmiarem substancji o znaczeniu biologicznym, są niezwykle istotne dla zrozumienia zasad funkcjonowania naszego organizmu, w sytuacji nadmiernej produkcji kwasu moczowego lub nadmiernych ilości suplementowanej witaminy B₁₂, potwierdzając negatywny wpływ ich nadmiernej ilości na fizjologiczne funkcje białek układu krwionośnego, zarówno hemoglobiny, jak i albuminy.

Podsumowanie najważniejszych osiągnięć badawczych w cyklu prac habilitacyjnych

Badania podjęte przeze mnie w ramach cyklu prac habilitacyjnych dotyczyły analizy niekowalencyjnych oddziaływań asocjacyjnych z udziałem związków zawierających struktury porfiryne oraz związków aktywnych biologicznie. Kluczowym elementem tych prac było poznanie mechanizmu oddziaływania oraz wyliczenie wartości parametrów i stałych charakteryzujących spektroskopowe właściwości analizowanych układów.

1. Zmienne środowisko reakcji analizowanych układów podyktowane było różnymi właściwościami fizykochemicznymi, zarówno poszczególnych związków biologicznie aktywnych, jak i układów porfirynowych. W przeprowadzonych badaniach potwierdziłam, że budowa cząsteczki każdego związku porfiryнового wpływa na jej zdolność do przechodzenia w stan wzbudzony, a także stopień sprotonowania jej pierścienia, co ma znaczący wpływ na sposób oddziaływania porfiryn z innymi substancjami. Dlatego w przedstawionych badaniach potwierdziłam, że różnice w wartościach stałych asocjacji są konsekwencją struktury przestrzennej poszczególnych porfiryn: zarówno rozmiar, jak i ładunek poszczególnych rodzajów podstawników przyłączonych do pierścienia porfiryнового, a także obecność lub brak jonów metalu we wnętrzu porfiryновой determinują położenie i liczbę miejsc wiążących, wpływając tym samym na mechanizm reakcji [88]. Pomimo różnych wartości pH środowiska badanych układów, uzyskane wyniki wskazują na podobne typy oddziaływania oraz na powstawanie kompleksów asocjacyjnych w stanie podstawowym pod wpływem niekowalencyjnych oddziaływań asocjacyjnych π - π pomiędzy związkami aromatycznymi, jakimi są zarówno porfiryny, jak i związki biologicznie aktywne, zastosowane w prezentowanych badaniach.

2. We wszystkich analizowanych układach, oprócz badań zamieszczonych w pracy [H6], potwierdziłam istnienie statycznego mechanizmu wygaszania fluorescencji. Uzyskane wyniki wskazują na niezaprzeczalny wpływ wszystkich stosowanych podczas wykonywania badań związków biologicznie aktywnych na właściwości spektroskopowe układów porfirynowych. Wyliczone wartości stałych asocjacji, stałych wygaszania fluorescencji oraz czasów życia analizowanych układów odpowiadają wartościom literaturowym dla podobnych układów i potwierdzają powstawanie niekowalencyjnych układów asocjacyjnych w stanie podstawowym, zwanych też układami asocjacyjnymi π - π .

3. Każdy z analizowanych układów prezentuje nieco inne zmiany w widmach absorpcji i emisji, związane przede wszystkim z budową porfiryny, a także z budową oraz rozpuszczalnością poszczególnych związków biologicznie aktywnych. W zależności od pH środowiska reakcji oraz procesów konkurencyjnych, które mogą zachodzić jednocześnie w roztworach zawierających analizowane układy (np. reakcje protonowania), związki porfiryne mogą występować w różnych formach. Z przeprowadzonych badań wynika, że każda z tych form jest w stanie oddziaływać, w różnym stopniu, ze związkami aktywnymi biologicznie, tworząc niekowalencyjne kompleksy asocjacyjne.

4. Największy zanik intensywności fluorescencji zaobserwowałam w przypadku porfiryny H₂TTMePP, którą uznałam za najlepszy układ modelowy do analizy niekowalencyjnych oddziaływań asocjacyjnych π - π pomiędzy układami porfirynowymi a związkami o znaczeniu biologicznym. Dowiodłam ponadto, że zarówno forma H₂P, jak i monoanion HP⁻ porfiryny H₂TTMePP mają właściwości fluorescencyjne.

5. Zaobserwowałam, że wartości stałych asocjacji i wygaszania fluorescencji w przypadku poszczególnych substancji wygaszających właściwości fluorescencyjne związków porfirynowych prezentują się następująco [**H1-H5**]:

kwas moczowy > guanina > kofeina > teofilina > teobromina > ksantyna

przy czym stałe wyliczone dla kwasu moczowego (i jego soli sodowej) oraz guaniny są około dwóch rzędów wielkości wyższe od stałych charakteryzujących układy asocjacyjne porfiryne ze związkami ksantynowymi. W obrębie związków ksantynowych moc oddziaływań z porfirydami oraz wartości stałych asocjacji i wygaszania fluorescencji są proporcjonalne do ilości grup metylowych znajdujących się w cząsteczce związku aktywnego biologicznie.

6. Na podstawie otrzymanych wyników udowodniłam, że w każdym z badanych układów można jednocześnie zaobserwować statyczne wygaszanie fluorescencji związków porfirynowych oraz ich oddziaływania specyficzne, związane ze zmianą formy fluorofora, wynikającą z charakterystycznej budowy cząsteczki porfiryny, podlegającej zmianom w zależności od pH środowiska reakcji, oraz jej właściwości fizykochemicznych.

7. Badania mechanizmu reakcji zachodzących w chloroformowych roztworach związków porfirynowych nierozpuszczalnych w wodzie pod wpływem naświetlania światłem widzialnym w obecności β -myrcenu, mimo że nie potwierdziły istnienia niekowalencyjnych oddziaływań asocjacyjnych w badanych układach, mogą być z powodzeniem wykorzystane

do stworzenia nowoczesnych materiałów wrażliwych na działanie światła widzialnego, co wpisuje się w tematykę badań dotyczących porfiryńowych czujników fluorescencyjnych. W pracy [H6] po raz pierwszy wykazałam, że zmianę formy porfiryny można otrzymać podczas naświetlania jej roztworu światłem widzialnym (a nie tylko światłem UV), co jest możliwe dzięki obecności w analizowanym układzie dodatkowej substancji, wpływającej na przyspieszenie fotodegradacji chloroformu.

8. Badania, które prowadziłam z wykorzystaniem białek hemoglobiny (HHb) [H7] i albuminy (BSA) [H8] wskazują, że zarówno kwas moczowy, jak i witamina B₁₂ mogą wpływać na zmianę konformacji obu białek, co może mieć wpływ na zaburzenie ich funkcji fizjologicznych. Wartości wyliczonych stałych asocjacji (trwałości) oraz wygaszania fluorescencji, a także parametrów FRET dla obu badanych układów i w tym przypadku wskazują na powstawanie niekowalencyjnych kompleksów asocjacyjnych, które wykazują zdolność zmiany struktury konformacyjnej obu białek, o czym można wnioskować ze zmian polarności zachodzących w sąsiedztwie fluoryzujących aminokwasów hemoglobiny i albuminy, czyli tryptofanu i tyrozyny. Otrzymane wyniki potwierdzają istnienie statycznego mechanizmu wygaszania fluorescencji HHb i BSA w analizowanych układach, co znajduje odzwierciedlenie w literaturze [89, 90]. W obu analizowanych układach (HHb – kwas moczowy oraz BSA – witamina B₁₂) prowadziłam pomiary z nadmiarem kwasu moczowego i witaminy B₁₂. Z praktyki klinicznej wiadomo, że nadmierna produkcja kwasu moczowego wywiera negatywny wpływ na człowieka. W zaprezentowanych badaniach [H7] wykazałam po raz pierwszy, w jaki sposób nadmiar kwasu moczowego może zaburzać fizjologiczne funkcje hemoglobiny. Natomiast w odniesieniu do suplementacji witaminy B₁₂ poruszany jest zazwyczaj problem niedoboru tego związku oraz jego skutków dla organizmu. W przypadku przedstawionych tutaj badań dotyczących BSA położyłam jednak nacisk na nadmierny pobór witaminy B₁₂, który, jak teoretycznie udowodniłam [H8], może mieć również niekorzystne działanie. Oddziaływania kwasu moczowego i witaminy B₁₂ z białkami mogą w związku z tym prowadzić do zakłócenia fizjologicznych funkcji zarówno hemoglobiny, jak i albuminy, szczególnie w przypadku suplementacji zbyt dużych dawek witaminy B₁₂ lub nadmiernej produkcji kwasu moczowego. Dlatego przedstawione badania mają potencjalnie duże znaczenie medyczne i toksykologiczne, dostarczając cennych informacji na temat oddziaływań asocjacyjnych w układach białko – związek biologicznie aktywny, jak również na temat właściwości farmakologicznych tych związków.

9. Omówiona wyżej analiza mechanizmu niekowalencyjnych oddziaływań asocjacyjnych ze związkami biologicznie aktywnymi, zachodzących w podobny sposób zarówno w przypadku związków porfiryńowych, jak i białek, pozwala na wykorzystanie otrzymanych przeze mnie wyników do zrozumienia i próby rozwiązania dwóch różnych, ale równie ważnych problemów, dotyczących zarówno monitorowania szkodliwych substancji o znaczeniu biologicznym, jak i przybliżenia sposobu ich oddziaływania na organizmy żywe. Na uwagę zasługuje też matematyczna strona wykonywanych badań – przy obecnym poziomie nauki same pomiary spektroskopowe mogą być podstawą jedynie wniosków jakościowych, natomiast poparte obliczeniami odpowiednich parametrów charakteryzujących właściwości spektroskopowe badanych układów prezentują kompletny obraz analizowanych oddziaływań.

Omówione wyżej charakterystyczne właściwości porfiryn nie pozostawiają wątpliwości, że związki należące do tej klasy są idealnymi kandydatami do roli czujników pozwalających na monitorowanie różnego typu reakcji z wieloma rodzajami substancji. Uzyskane przeze mnie w cyklu prac habilitacyjnych wyniki mogą stać się podstawą do opracowania nowej, czulej i szybkiej metody monitorowania śladów substancji biologicznie aktywnych i leków w środowisku wodnym [H1-H5] (lub w rozpuszczalnikach organicznych [H6]) z wykorzystaniem związków porfiryńowych, a także pomóc w lepszym zrozumieniu wpływu substancji toksycznych [H7], bądź potencjalnie leczniczych [H8] na organizmy żywe, co przy coraz większym obecnie zanieczyszczeniu lekami wód lądowych i morskich może mieć duże znaczenie przede wszystkim w aspekcie ochrony środowiska. Jako że badanie niekowalencyjnych oddziaływań asocjacyjnych, tak układów porfiryńowych, jak i białek, ze związkami biologicznie aktywnymi jest bardzo istotne, zarówno w aspekcie medycznym, jak i ochrony środowiska, wykonanie tego typu badań uważam za zasadne i potencjalnie przydatne we wspomnianych wyżej dziedzinach życia.

Literatura uzupełniająca

- [1] J.L. Rodríguez-Gil, M. Catalá, S. González Alonso, R. Romo Maroto, Y. Valcarcel, Y. Segura, R. Molina, J.A. Melero, F. Martinez, *Chemosphere* 80 (2010) 381-388.
- [2] O. Opris, F. Copaciu, M.L. Soran, D. Ristoiu, U. Niinemets, L. Copolovici, *Ecotox. Environ. Safe.* 87 (2013) 70-79.
- [3] A. Jagoda, W. Żukowski, B. Dąbrowska, *Środowisko. Czasopismo techniczne. Wydawnictwo Politechniki Krakowskiej* 6 (2011) 99-108.
- [4] M. Makarska, S. Radzki, *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska Lublin – Polonia* 57 (2002) 332-363.
- [5] B. Szyszko, M.J. Białek, E. Pacholska-Dudziak, L. Latos-Grażyński, *Chem. Rev.* 117 (2017) 2839-2909.
- [6] B. Szyszko, L. Latos-Grażyński, *Chem. Soc. Rev.* 44 (2015) 3588-3616.
- [7] J. Wojaczyński, L. Latos-Grażyński, *Coordin. Chem. Rev.* 204 (2000) 113-171.
- [8] M. Tabata, M. Kumamoto, J. Nishimoto, *Anal. Chem.* 68 (1996) 758-762.
- [9] X. Zhang, M. Gao, X. Kong, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1994) 1055-1056.
- [10] J. Hayon, D. Ozer, J. Rishpon, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1994) 619-620.
- [11] C. Di Natale, R. Paolesse, A. Macagnano, *Sensors Actuat. B-Chem* 52 (1998) 162-168.
- [12] M. Merchat, J. D. Spikes, G. Bertoloni, *J. Photochem. Photobiol. B* 35 (1996) 149-157.
- [13] L. R. Milgrom, *The colors of life: an introduction to the chemistry of porphyrins and related compounds*; Oxford University Press, UK, 1997.
- [14] T. J. Dougherty, C. J. Gomer, B. W. Henderson, *J. Natl Cancer Inst.* 90 (1998) 889-905.
- [15] D. Kessel, T. J. Dougherty, *Rev. Contemp. Pharmacother.* 10 (1999) 19-24.
- [16] U. Bindig, A. Ulatowska-Jarża, M. Kopaczyńska, G. Muller, H. Podbielska, *Laser Phys.* 18 (2008) 63-72.
- [17] I. Hołowacz, A. Ulatowska-Jarża, K. Wysocka, P. Głuchowski, W. Stręk, H. Podbielska, *Opt. Apel.* 38 (2008) 49-56.
- [18] H. Podbielska, A. Ulatowska-Jarża, G. Muller, W. Hołowacz, J. Bauer, U. Bindig, *Biomol. Eng.* 24 (2007) 425-433.
- [19] M. Makarska, G. Pratiel, *J. Biol. Inorg. Chem.* 13 (2008) 973-979.

- [20] M. Kalinowska, G. Świdorski, M. Matejczyk, W. Lewandowski, *J. Therm. Anal. Calorim.* 126 (2016) 141-148.
- [21] W. Lewandowski, H. Barańska, *Appl. Spectrosc.* 41 (1987) 976-980.
- [22] R. Świsłocka, J. Piekut, W. Lewandowski, *Spectrochim. Acta A* 100 (2013) 31-40.
- [23] J. Piosik, M. Zdunek, J. Kapuściński, *Biochem. Pharmacol.* 63 (2002) 635-646.
- [24] M. Zdunek, J. Piosik, J. Kapuściński, *Biophys. Chem.* 84 (2000) 77-85.
- [25] A. Woziwodzka, A. Gwizdek-Wiśniewska, J. Piosik, *Bioorg. Chem.* 39 (2011) 10-17.
- [26] K. Fink, J. Boratyński, *Postepy Hig. Med. Dosw. (online)*, 68 (2014) 1276-1286.
- [27] R. Kruszyński, *Zeszyty Naukowe Politechniki Łódzkiej, Chemia z.* 50, Nr 1086 (2011) 5-47.
- [28] M.P. Evstigneev, *Int. Rev. Phys. Chem.* 33 (2014) 229-273.
- [29] M.P. Evstigneev, *Org. Chem. Int.* (2013) <http://dx.doi.org/10.1155/2013/278143>.
- [30] H.S. Park, N.G. Im, K.H. Kim, *LWT - Food Sci. Technol.* 45 (2012) 73-78.
- [31] L. Huang, L. Li, H. Li, S. Tian, H. Cui, J. Kong, *Spectrosc. Lett.* 46 (2013) 433-440.
- [32] W. Wang, W. Zhang, Y. Duan, Y. Jiang, L. Zhang, B. Zhao, P. Tu, *Spectrochim. Acta A* 115 (2013) 57-62.
- [33] S. Sauve, K. Aboufadel, S. Dorner, P. Payment, G. Deschamps, M. Prévost, *Chemosphere* 86 (2012) 118-123.
- [34] P. Mohanpuria, S.K. Yadav, *Photosynthetica* 47 (2009) 293-297.
- [35] K. Pollack, K. Balazs, O. Ogunseitan, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 2085-2091.
- [36] M. Makarska-Białokoz, A. Lipke, M. Majdan, *Przemysł Chemiczny* 91 (2012) 511-516.
- [37] N.N. Kruk, S.I. Shishporenok, A.A. Korotky, V.A. Galievsky, V.S. Chirvony, P. Y. Turpin, *J. Photochem. Photobiol., B* 45 (1998) 67-74.
- [38] T. Yamashita, T. Uno, Y. Ishikawa, *Bioorg. Med. Chem.* 13 (2005) 2423-2430.
- [39] R. Jasuja, D.M. Jameson, C.K. Nishijo, R.W. Larsen, *J. Phys. Chem.* 101 (1997) 1444-1450.
- [40] V.S. Chirvony, V.A. Galievsky, N.N. Kruk, B.M. Dzhagarov, P.Y.J. Turpin, *J. Photochem. Photobiol., B* 40 (1997) 154-162.
- [41] I.V. Sazanovich, E.P. Petrov, V.S. Chirvony, *Opt. Spectrosc.* 100 (2006) 209-218.

- [42] P.M. Keane, J.M. Kelly, *Photochem. Photobiol. Sci.* 10 (2011) 1578-1586.
- [43] P.E. Hartman, D.M. Shankel, *Environ. Mol. Mutagen.* 67 (1990) 145-182.
- [44] A. Osowski, M. Pietrzak, Z. Wieczorek, J. Wieczorek, *J. Toxicol. Env. Heal. A* 73 (2010) 1141-1149.
- [45] J.R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, Springer, 3rd ed., 2006.
- [46] M. Gouterman, *Optical spectra and electronic structure of porphyrins and related rings*, w: D. Dolphin (ed), *The Porphyrins*, vol. III. Academic, New York (1978).
- [47] M. Whitworth, *Lifestyle Telegraph* (2008-10-16).
- [48] Y.L. Wei, C. Dong, S.M. Shuang, D.S. Liu, *Spectrochim. Acta A* 61 (2005) 2584-2589.
- [49] H.M. Zhang, T.T. Chen, Q.H. Zhou, Y.Q. Wang, *J. Mol. Struct.* 938 (2009) 221-228.
- [50] A. Woziwodzka, A. Gwizdek-Wisniewska, J. Piosik, *Bioorg. Chem.* 39 (2011) 10-17.
- [51] A. Osowski, M. Pietrzak, Z. Wieczorek, J. Wieczorek, *J. Toxicol. Environ. Health Part A* 73 (2010) 1141-1149.
- [52] J. Piosik, A. Gwizdek-Wisniewska, K. Ulanowska, J. Ochociński, A. Czyż, G. Węgrzyn, *Acta Biochim. Pol.* 52 (2005) 923-926.
- [53] H.K. Choi, W. Willett, G. Curhan, *Arthritis Rheum.* 56 (2007) 2049-2055.
- [54] J. Gonzales-Jimenez, G. Frutos, Y. Cayre, *Biochem. Pharmacol.* 44 (1992) 824-826.
- [55] R.D. Chaudhari, A.B. Joshi, R. Srivastava, *Sensor. Actuat. B* 173 (2012) 882.
- [56] P. Schrenkhammer, O.S. Wolfbeis, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2008) 994-999.
- [57] T. Zhang, X. Sun, B. Liu, *Spectrochim. Acta A* 79 (2011) 1566-1572.
- [58] P.A. Robles-Dutenhefner, M.G. Speziali, E.M.B. Sousa, E.N. dos Santos, E.V. Gusevskaya, *Appl. Catal. A Gen.* 295 (2005) 52-58.
- [59] A. Kaczor, I. Reva, D. Warszycki, R. Fausto, *J. Photoch. Photobio. A* 222 (2011) 1-9.
- [60] O. Boge, A. Mutzel, Y. Iinuma, P. Yli-Pirila, A. Kahnt, J. Joutsensaari, H. Herrmann, *Atmos. Environ.* 79 (2013) 553-560.
- [61] L.M. Scolaro, A. Romeo, M.A. Castriciano, G. De Luca, S. Patane, N. Micali, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 2040-2041.
- [62] C. Feiyan, S.O. Pehkonen, M.B. Ray, *Water Res.* 36 (2002) 4203-4214.
- [63] C.C. Wang, Z. Zhang, J.Y. Ying, *Nanostructured Mater.* 9 (1997) 583-586.

- [64] W. He, H. Dou, Z. Li, X. Wang, L. Wang, R. Wang, J. Chang, *Spectrochim. Acta A* 123 (2014) 176-186.
- [65] T. Chen, S. Zhu, H. Cao, Y. Shang, M. Wang, G. Jiang, Y. Shi, T. Lu, *Spectrochim. Acta A* 78 (2011) 1295-1301.
- [66] R. Mandal, R. Kalke, X.F. Li, *Chem. Res. Toxicol.* 17 (2004) 1391-1397.
- [67] L. Messori, C. Gabbiani, A. Casini, M. Siragusa, F.F. Vincieri, A.R. Bilia, *Bioorg. Med. Chem.* 14 (2006) 2972-2977.
- [68] B. Bukowska, A. Kopka, J. Michaowicz, W. Duda, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 22 (2006) 189-193.
- [69] Y. Cui, J.F. Guo, B.J. Xu, Z.Y. Chen, *Pestic. Biochem. Physiol.* 85 (2006) 110-114.
- [70] H.M. Abu-Soud, D. Maitra, J. Byun, C.E.A. Souza, J. Banerjee, G.M. Saed, M.P. Diamond, P.R. Andreana, S. Pennathur, *Free Radic. Biol. Med.* 52 (2012) 616-625.
- [71] R.C. Dart, *Clin. Toxicol.* 44 (Suppl. 1) (2006) 1-3.
- [72] <http://www.newhealthguide.org/Vitamin-B12-Overdose.html>.
- [73] T. Peters, *All about Albumin. Biochemistry, Genetics and Medical Applications*, Academic Press, 1995.
- [74] Q. Wu, F. Jiang, C. Li, Y. Hu, Y. Liu, *Chin. J. Chem.* 29 (2011) 433-440.
- [75] H.N. Hou, Z.D. Qi, Y.W. OuYang, F.L. Liao, Y. Zhang, Y. Liu, *J. Pharmaceut. Biomed.* 47 (2008) 134-139.
- [76] J. Jang, H. Liu, W. Chen, G. Zou, *J. Mol. Struct.* 928 (2009) 72-77.
- [77] A. Varshney, Y. Ansari, N. Zaidi, E. Ahmad, G. Badr, P. Alam, R.H. Khan, *Cell Biochem. Biophys.* 70 (2014) 93-101.
- [78] D. Evren, I. Ozcesmeci, B.S. Sesalan, A.K. Burat, *Synthetic Met.* 168 (2013) 31-35.
- [79] A. Mallick, B. Haldar, N. Chattopadhyay, *J. Phys. Chem. B* 109 (2005) 14683-14690.
- [80] Y. Teng, R.T. Liu, S.F. Yan, X.R. Pan, P.J. Zhang, M.J. Wang, *J. Fluoresc.* 20 (2010) 381-387.
- [81] H. Sanei, A. Asoodeh, S. Hamedakbari-Tusi, J. Chamani, *J. Solution Chem.* 40 (2011) 1905-1931.
- [82] D. Li, T. Zhang, C. Xu, B. Ji, *Spectrochim. Acta A* 83 (2011) 598-608.
- [83] M. Voicescu, D.G. Angelescu, S. Ionescu, V.S. Teodorescu, *J. Nanopart. Res.* 15 (2013) 1555-1564.
- [84] P. Mandal, M. Bardham, T. Ganguly, *J. Photochem. Photobiol. B* 99 (2010) 78-86.

- [85] B. Alpert, D.M. Jameson, G. Weber, *Photochem. Photobiol.* 31 (1980) 1-4.
- [86] S. De, A. Girigoswami, *J. Colloid Interface Sci.* 296 (2006) 324-331.
- [87] S.Y. Wang, X.L. Xu, Q.L. Liu, Y.S. Xie, *Prog. Chem.* 13 (2001) 257-260.
- [88] M. Tabata, M. Sakai, K. Yoshioka, *Anal. Sci.* 6 (1990) 651-656.
- [89] S. Hazra, M. Hossain, G. Suresh Kumar, *Molecular BioSystems* 9 (2013) 142-153.
- [90] A.C. Vaiana, H. Neuweiler, A. Schulz, J. Wolfrum, M. Sauer, J.C. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 14564-14572.

6.DZIAŁALNOŚĆ NAUKOWO-BADAWCZA

Działalność naukowa przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora

W roku akademickim 1996/97 otrzymałam **stypendium Ministra Edukacji Narodowej** za wysokie wyniki w nauce i szczególne osiągnięcia w pracy naukowej, realizowane dzięki przynależności do **Studenckiego Koła Naukowego Chemików UMCS** (1994-1997) oraz **Studenckiego Koła Naukowego Biochemików UMCS** (1992-1997). W ramach badań prowadzonych w Studenckim Kole Naukowym Biochemików miałam okazję do współpracy z **Dr Agnieszką Anasiewicz** z Zakładu Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie (1994-1995), wykonując badania nad wpływem leków przeciwnowotworowych na organizmy żywe, czego podsumowaniem stała się 1 publikacja. Współpracowałam też z **Dr Ewą Urbańską** z Katedry i Zakładu Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie (1996-1997), przeprowadzając doświadczenia dotyczące roli aminokwasów pobudzających w fizjologii i patologii człowieka. Wynikiem mojej kilkuletniej pracy w kołach naukowych były liczne wystąpienia ustne i posterowe, zaprezentowane na konferencjach studenckich, organizowanych głównie pod egidą **Akademickiego Stowarzyszenia Studentów Chemii (ASSCh)** przez studentów kół naukowych z uczelni całej Polski, w których uczestniczyłam za zgodą i dzięki wsparciu finansowemu Władz Wydziału Chemii UMCS. W latach 1993-1999 uczestniczyłam aktywnie w 12 takich konferencjach (*Ogólnopolskie Sympozjum Studenckich Kół Naukowych „Nauka a ochrona środowiska”*, Kazimierz Dolny, 10-12.10.1993; *I Ogólnopolska Jesienna Szkoła Chemii*, Jugowice, 11-15.11.1994; *II Ogólnopolska Wiosenna Szkoła Chemii*, Nałęczów, 28.04-3.05.1995; *III Ogólnopolska Jesienna Szkoła Chemii*, Złoty Las, 6-10.12.1995; *IV Ogólnopolska Wiosenna Szkoła Chemii*, Krasnobród, 24-28.04.1996; *V Ogólnopolska Jesienna Szkoła Chemii*, Murzasichle, 23-27.10.1996; *17th Congress of the Polish Anatomical Society with International Participation*, Gdańsk, 3-6.09.1996; *XXVI Ogólnopolska Konferencja Studenckich Towarzystw Naukowych*, Łódź, 24-25.04.1997; *VI Ogólnopolska Wiosenna Szkoła Chemii*, Szklarska Poręba, 29.04-4.05.1997; *VII Ogólnopolska Jesienna Szkoła Chemii*, Zajączkowo, 7-11.11.1997; *VIII Ogólnopolska Wiosenna Szkoła Chemii*, Susiec, 28.04-3.05.1998; *IX Ogólnopolska Jesienna Szkoła Chemii*, Smerek, 9-14.11.1998; *X Ogólnopolska Wiosenna Szkoła Chemii*, Karpacz, 26.04-1.05.1999).

W okresie 28.05-10.08.1996 uczestniczyłam w programie **Summer Undergraduate Research Program** (Baylor University, Waco, Texas, USA), gdzie pod opieką **Prof. Kevina**

Pinney'a zajmowałam się syntezą nowych związków o potencjalnym działaniu antynowotworowym i antymitotycznym. Otrzymane wyniki zostały zaprezentowane na sesji posterowej podsumowującej badania wykonane przeze mnie w Baylor University.

W ramach badań prowadzonych podczas przygotowywania pracy magisterskiej (*Badanie odzysków propofolu i tymolu z osocza i krwinek metodą ekstrakcji ciecz-ciecz*, Lublin 1997) pod kierunkiem **Prof. dr. hab. Andrzeja L. Dawidowicza** w Zakładzie Fizyki Chemicznej i Fizykochemicznych Metod Rozdzielania (obecnie Zakład Metod Chromatograficznych), zajmowałam się metodyką przygotowania próbek krwi do analizy propofolu. Propofol (Diprivan, 2,6-diizopropylfenol) należy do grupy dożylnie podawanych substancji anestetycznych, działających, w zależności od dawki, do kilku minut. Używany jest do zabiegów chirurgicznych typu *one day surgery* (ang.), wymagających krótkiego snu. Jak wiadomo, układ krwionośny stanowi podstawowy mechanizm organizmu odpowiedzialny za przenoszenie pobranych leków. Głównym czynnikiem rozprawdzającym są białka osocza, które tworzą kompleksy niekowalencyjne ze znajdującym się we krwi lekiem, ale w przypadku propofolu można mówić również o wiązaniu się z morfotycznymi elementami krwi. Aby wybrać najkorzystniejszy ekstrahent propofolu z osocza i z krwinek przebadalam 12 rozpuszczalników, należących do różnych grup pod względem charakteru chemicznego. Uzyskane wyniki potwierdziły pełniejszą ekstrakcję propofolu z osocza, w porównaniu z krwinkami, co mogło być następstwem wnikania propofolu do wnętrza krwinek i trudności z jego odzyskaniem. Część teoretyczna mojej pracy magisterskiej, będąca omówieniem różnych technik analitycznych stosowanych w analizie krwi (chromatografii HPLC, technik immunologicznych i elektrokapilarnych), a także monitorowania leków we krwi i innych matrycach ciała i płynach fizjologicznych (włosach, ślinie, płynie mózgowo-rdzeniowym, mleku kobiecym) stała się podstawą mojej pierwszej publikacji naukowej.

Pracę naukowo-badawczą rozpoczęłam w zespole kierowanym przez **Dr hab. Stanisława Radzkiego** w Zakładzie Chemii Ogólnej i Nieorganicznej (obecnie Zakładzie Chemii Nieorganicznej) Wydziału Chemii UMCS jako uczestnik Studiów Doktoranckich (01.10.1997-24.09.2001) i kontynuuję ją do dzisiaj, najpierw na stanowisku adiunkta (2001-2015), a następnie asystenta (2015-2017). W ramach wspomnianych studiów przygotowałam rozprawę doktorską zatytułowaną *Charakterystyka związków kompleksowych kationowych porfiryn rozpuszczalnych w wodzie*. Można uznać, że badania przeze mnie wykonane i przedstawione w rozprawie doktorskiej dotyczyły kilku dziedzin chemii: zastosowania metod

spektroskopowych w chemii związków porfiryńowych, chemii analitycznej, organicznej syntezy chemicznej oraz chemii bioinorganicznej. Celem rozprawy doktorskiej była fizykochemiczna charakterystyka dwóch wybranych kationowych porfiryn rozpuszczalnych w wodzie oraz ich kompleksów z jonami Cu(II), otrzymanych podczas badań pilotażowych w wyniku prostego zmieszania roztworów. Specyficzne właściwości fizykochemiczne rozpatrywanych związków analizowałam w oparciu o reakcje protonowania, kompleksowania i dimeryzacji. Wybór tematyki pracy podyktowany był rosnącym zainteresowaniem chemią związków porfiryńowych i dużą ilością i różnorodnością zastosowań tej klasy związków, a szczególnie zastosowań medycznych. Dodatkowym aspektem mojej pracy, podnoszącym walory przedstawionej rozprawy, było opisanie syntezy kompleksów Cu(II) z innym typem porfiryn – porfirynami glikozydowanymi, zawierającymi „ramię przestrzenne”. Synteza ta była tematem mojego stażu odbytego w ramach stypendium z programu Erasmus w *Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, Universite de Limoges* we Francji (31.01-30.04.2000), pod opieką naukową **Prof. Pierre’a Krausza**. Otrzymane podczas odbywania stażu wyniki stały się podstawą 1 publikacji, 1 rozdziału w monografii w języku polskim oraz 1 posteru. W ramach studiów doktoranckich w okresie 25-30.09.1999 odbyłam także staż naukowy w Zakładzie Ziem Rzadkich Wydziału Chemii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu, pod opieką **Prof. dr hab. Mariana Elbanowskiego**. Głównym celem naukowym tego stażu było wykonanie badań dotyczących chemiluminescencji kationowych porfiryn rozpuszczalnych w wodzie. Przeprowadzone badania skłoniły mnie do zainteresowania się zagadnieniem fluorescencji porfiryn oraz metod jej pomiaru. Moje zainteresowanie tym tematem rozwijałam podczas prowadzenia dalszej pracy badawczej. Uzyskane w ramach mojej rozprawy doktorskiej wyniki badań mogą znaleźć zastosowanie w analizie oddziaływań układów porfiryńowych z wieloma typami związków i układów chemicznych, co może być wykorzystane m.in. w chemii barwników fluorescencyjnych, ochronie środowiska, czy naukach medycznych. Wyniki badań zamieszczone w pracy doktorskiej zostały opublikowane w formie 5 artykułów w czasopismach o zasięgu krajowym i 1 artykułu w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym, w 2 rozdziałach w monografiach (w języku polskim i angielskim) oraz zaprezentowane w formie 2 komunikatów, 2 wykładów i 8 posterów w trakcie krajowych i zagranicznych konferencji naukowych z dziedziny chemii. Interesujące wyniki otrzymałam zwłaszcza w pracy opublikowanej w *Journal of Alloys and Compounds* [M. Makarska, S. Radzki, J. Legendziewicz, J. Alloy. Compd. 341 (2002) 233-238], a dotyczącej charakterystyki właściwości spektroskopowych kationowych porfiryn rozpuszczalnych w

wodzie i ich kompleksów z jonami Cu(II) w zależności od polarności rozpuszczalników, w których badane związki zostały rozpuszczone. W pracy tej parametr polarności Reichardta został skorelowany z długością fali maksimum pasma Soreta każdego z badanych związków porfiryńowych. Wspomniana publikacja dotyczy fundamentalnych właściwości tej grupy porfiryn, dlatego doczekała się do tej pory aż 28 cytowań (wg Web of Science).

Działalność naukowa po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

W latach 2001-2008, oprócz realizacji swojej tematyki badawczej, dotyczącej właściwości spektroskopowych związków porfiryńowych, angażowałam się w różny sposób w badania dotyczące również innych tematów badawczych realizowanych w Zakładzie Chemii Nieorganicznej Wydziału Chemii UMCS, w zespole **Dr. hab. Stanisława Radzkiego, prof. UMCS**. Interesowały mnie zwłaszcza zagadnienia związane z otrzymywaniem transparentnych materiałów krzemionkowych metodą *sol-gel* oraz dotowaniem tych materiałów związkami porfiryńowymi i białkami, a także analizą właściwości spektroskopowych otrzymanych przy użyciu wspomnianej metody próbek. Efekty mojej współpracy ze studentami i doktorantami z zespołu prof. Stanisława Radzkiego zostały opublikowane w wielu doniesieniach konferencyjnych i 8 publikacjach naukowych, w tym 2 z listy JRC.

W okresie 26.04-26.05.2003 odbyłam staż naukowy w **Department of Inorganic and Analytical Chemistry, University of Szeged** (Węgry), pod opieką naukową **Prof. Imre Labadiego**. Głównym celem naukowym tego wyjazdu było badanie kinetyki reakcji asocjacji i kompleksowania kationowych porfiryn rozpuszczalnych w wodzie za pomocą programu komputerowego *Psequad*. Przeprowadzone obliczenia skłoniły mnie do zainteresowania się matematycznym aspektem reakcji z udziałem związków porfiryńowych. Moje zainteresowanie tym tematem rozwijałam podczas prowadzenia dalszej pracy badawczej.

W okresie 2.11.2003-30.10.2004 odbyłam staż podoktorski, uzyskany z **NATO Fellowship**, w **Laboratoire de Chimie de Coordination du CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique)** we Francji, pod opieką naukową **Prof. Geneviève Pratviel** oraz **Prof. Bernarda Meunier**. Nadrzędnym założeniem stażu podoktorskiego było wykonanie projektu zatytułowanego „**Long range charge-transfer within DNA: what is the chemical damage on DNA?**” Głównym celem realizowanego przeze mnie projektu badawczego było

określenie struktury uszkodzeń guaniny powstających podczas utleniania łańcucha DNA na skutek przeniesienia elektronu na dużą odległość. Projekt obejmował następujące etapy:

- [1] syntezę i oczyszczenie dwóch rozpuszczalnych w wodzie kompleksów porfiryn z jonami Fe(III) i Mn(III) (iron(III) 5-[(4-(5-carboxy-1-butoxy)-phenyl]-10,15,20-tris(4-*N*-methylpyridiumyl) porphyrin (FeP) oraz manganese(III) 5-[(4-(5-carboxy-1-butoxy)-phenyl]-10,15,20-tris(4-*N* methylpyridiumyl)porphyrin (MnP));
- [2] przygotowanie i oczyszczenie odpowiedniej sekwencji oligonukleotydu z końcową grupą NH₂ (5'-CTCCGCTTCTTCCTGCCAT), a także oczyszczenie innych sekwencji DNA potrzebnych do dalszej analizy;
- [3] syntezę i oczyszczenie dwóch sprzężonych układów metaloporfiryna – oligonukleotydu, powstających pomiędzy otrzymanymi kompleksami porfiryn (FeP i MnP), a odpowiednio przygotowaną sekwencją DNA;
- [4] analizę na żelu poliakrylamidowym uszkodzeń guaniny powstających w znakowanym radioizotopem ³²P łańcuchu DNA, rozszczepionym na skutek reakcji z KHSO₅ i piperydyną.

Otrzymane podczas stażu wyniki były tematem 2 publikacji naukowych oraz 1 posteru.

W 2008 r., po nagłej śmierci promotora mojej pracy doktorskiej i późniejszego bezpośredniego przełożonego, Dr hab. Stanisława Radzkiego, prof. UMCS, kontynuowałam pracę naukowo-badawczą w zespole **Prof. dr hab. Marka Majdana**, również w Zakładzie Chemii Nieorganicznej Wydziału Chemii UMCS. W latach 2009-2017 współpracowałam ze studentami i pracownikami z Zakładu Chemii Nieorganicznej Wydziału Chemii UMCS należącymi do grupy badawczej Prof. dr. hab. Marka Majdana. Współpraca z Prof. dr. hab. Markiem Majdanem, a także z **Dr Agnieszką Gładysz-Płaską** i **Mgr Agnieszką Lipke**, dotycząca zagadnień dotowania porfirynami żeli krzemionkowych oraz osadzania m.in. związków porfiryńowych na zeolitach i naturalnych glinach, zaowocowała kilkoma doniesieniami konferencyjnymi i 3 publikacjami naukowymi.

W okresie 17-23.06.2012 uczestniczyłam w programie **Teaching Staff Mobility (Erasmus Program)**, odwiedzając **Department of Analytical Chemistry (Afyon Kocatepe University, Turcja)**, na zaproszenie **Prof. Mustafy Uçara**. Głównym celem wyjazdu było zaprezentowanie pracownikom i studentom uniwersytetu serii 5 wykładów pod wspólnym tytułem “Application of zeolites in the study of porphyrin systems”, w ramach programu

Teaching Staff Mobility. Dodatkowo, w ramach pobytu w Afyon Kocatepe University odbyłam konsultacje naukowe dotyczące oddziaływań zeolitów z porfirynami.

W latach 2011-2017 współpracowałam z **Dr Agnieszką A. Kaczor** (obecnie dr hab.) z Katedry i Zakładu Syntezy i Technologii Chemicznej Środków Leczniczych z Pracownią Modelowania Komputerowego z Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Współpraca dotyczyła procesów modelowania molekularnego oddziaływań asocjacyjnych badanych przeze mnie układów porfiryńowych, a także zastosowania różnych technik spektroskopowych w badaniach medycznych i farmaceutycznych. Ukoronowaniem tej współpracy jest kilka doniesień konferencyjnych i 3 publikacje naukowe.

Aktualnie współpracuję z **Dr hab. Beatą Jasiewicz, prof. UAM**, z Pracowni Chemii Związków Heterocyklicznych, Wydziału Chemii, Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu. Nasza współpraca dotyczy określenia mechanizmu oddziaływań tiopochodnych kofeiny, otrzymanych w grupie Pani Prof. Beaty Jasiewicz, z badaną przeze mnie porfiryną H₂TTMePP. Otrzymane ostatnio syntetyczne tiopochodne kofeiny wykazują właściwości antyoksydacyjne, chroniąc jednocześnie erytrocyty ludzkie przed hemolizą indukowaną działaniem niebezpiecznych dla żywych organizmów związków chemicznych, dlatego badanie ich oddziaływań z porfiryną, wykazującą idealne predyspozycje do wypełnienia roli czujnika fluorescencyjnego, wydaje się być niezwykle istotne.

W 2009 r., po powrocie z urlopu macierzyńskiego, podjęłam też nowe badania dotyczące niekowalencyjnych oddziaływań związków zawierających układy porfiryńowe z substancjami biologicznie aktywnymi, które stały się podstawą osiągnięć prezentowanych w niniejszym Autoreferacie. W latach 2012-2017 opublikowałam z tej tematyki **8 prac w czasopismach z listy filadelfijskiej**. Mój łączny dorobek naukowy stanowi **39 prac** (artykułów lub rozdziałów w opracowaniach zbiorowych), w tym **19 artykułów z listy JRC**. Sumaryczny impact factor prac zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **34.869**, indeks Hirscha: **8**.

Kontynuacją przedstawionej w niniejszym Autoreferacie mojej pracy badawczej są kolejne 2 publikacje dotyczące zagadnienia niekowalencyjnych oddziaływań układów porfiryńowych oraz białek z kofeiną i kwasem moczowym, które znajdują się obecnie w recenzji w czasopismach z listy JRC. Trzy inne prace dotyczące wspomnianych zagadnień (w

tym *mini-review*) są w przygotowaniu. W przyszłości chciałabym wzbogacić tematykę moich badań o analizę oddziaływań niekowalencyjnych związków porfirynowych z substancjami biologicznie aktywnymi znajdującymi się w rzeczywistych systemach wodnych, takich jak m.in. zbiorniki należące do oczyszczalni ścieków. Wierzę, że tego typu badania mogłyby wnieść znaczący wkład do zagadnienia dotyczącego oczyszczania ścieków zawierających pozostałości leków i innych produktów farmaceutycznych.

Magdalena Makarska-Białokoz