

## Streszczenie

Niedotlenienie tkanek jest patologicznym stanem towarzyszącym różnego rodzaju zaburzeniom i bezpośrednio przyczyniającym się do uszkodzenia, a w ostateczności również śmierci tkanek, narządów i całego organizmu. Można wyróżnić kilka rodzajów hipoksji, zależnych od wywołujących ją czynników (hipoksja oddechowa, krwiopochodna, krążeniowa, czy histotoksyczna). Niezależnie jednak od przyczyny, istnieją pewne uniwersalne mechanizmy indukowane spadkiem zawartości tlenu w komórkach. Organizm, próbując skompensować braki w zaopatrzeniu może wykorzystać kilka linii obrony, m. in. rezerwy tlenu związanego we krwi, czy uruchomienie czynnika indukowanego hipoksją, a dalej również modyfikację szlaków komórkowych oraz ekspresję pewnych genów tak, aby zmniejszyć zużycie tlenu na tym poziomie. Jeśli komórki wykorzystają wszystkie rezerwy tlenu, bez nowych dostaw zaczną umierać. W przypadku łagodnego wejścia w stan hipoksji, organizm ma czas na uruchomienie procesów programowanej śmierci, co umożliwia ograniczenie negatywnych konsekwencji. Jeśli natomiast czynnik zadziałał gwałtownie, wywoływana podczas hipoksji kaskada zdarzeń obejmuje również procesy uszkadzające komórkę (zaburzenia metabolizmu energetycznego, czy równowagi elektrolitowej) a w konsekwencji śmierć na drodze nekrotycznej, z wytworzeniem stanu zapalnego. Ze względu na powszechność występowania tego rodzaju zaburzeń (choroba niedokrwienna serca, nowotwory) oraz potencjalnie śmiertelny charakter, niezbędne są ciągłe prace na rzecz ochrony chorych przed ich szkodliwymi konsekwencjami.

Badane w Zakładzie Biologii Komórki związki z grupy 1,3,4-tiadiazoli należą do syntetycznych dwupodstawionych pochodnych heterocyklicznego układu tiadiazolu. Literatura naukowa dostarcza informacji o szerokim spektrum zastosowań tych substancji w przemyśle oraz przede wszystkim w nauce – jako m. in. barwniki, czynniki kompleksujące, ale również skuteczne środki przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciw pasożytnicze, antynowotworowe i inne. Część z nich wykorzystuje się w leczeniu.

W ramach niniejszej rozprawy przebadano dwie substancje z tej grupy, 4-(5-metyl-1,3,4-tiadiazol-2-yl)benzeno-1,3-diol (MTDBD, C1) i 4-(5-heptyl-1,3,4-tiadiazol-2-yl)benzeno-1,3-diol (HTDBD, C7), różniące się długością podstawnika acylowego. Do eksperymentów wykorzystano szereg technik, z których najistotniejszą rolę ogrywały metody

spektroskopii elektronowej i oscylacyjnej – spektroskopia zakresu ultrafioletu i światła widzialnego (UV-Vis), fluorescencyjna oraz spektroskopia w podczerwieni z transformatą Fouriera (FTIR). Innymi technikami była spektroskopia rezonansowego rozpraszania światła (RLS), dichroizm kołowy (CD), czy skaningowa mikrokalorymetria różnicowa (DSC). Metody spektroskopowe opierają się na swoistych interakcjach fal elektromagnetycznych różnych zakresów z badaną próbką.

W pierwszym etapie badane związki poddano analizie wpływu ośrodków o zróżnicowanej polarności czy stężeniu jonów wodorowych, a także w zakresie różnych stężeń samych substancji i zmian temperatury otoczenia. W ich wyniku, oraz przy pomocy obliczeń teoretycznych, określono spektralną charakterystykę badanych molekuł, opisano i zinterpretowano organizację molekularną monomerów oraz wyższych struktur zagregowanych w różnych środowiskach.

Powyższe wiadomości posłużyły w interpretacji wyników drugiej części badań – wykonanych na układach modelowych. Obie pochodne 1,3,4-tiadiazoli poddano eksperymentom z użyciem układów liposomalnych utworzonych z użyciem lecytyny dwupalmitynowej. Z racji częstego występowania w strukturach błon biologicznych, lipid ten stał się wstępnym źródłem informacji o molekularnym podłożu interakcji analizowanych molekuł z membraną uformowaną z DPPC. Wykorzystując wszystkie wymienione wyżej metody badawcze, zebrano dane o zasięgu interakcji molekuł tiadiazoli i lipidu w obszarach poszczególnych grup funkcyjnych, penetracji membrany, czy organizacji molekularnej związków w środowisku liposomów. Na podstawie posiadanych wyników dwóch części eksperymentalnych oceniono związek C7, jako przedstawiający większą selektywność w stosunku do wchodzenia w interakcje z membraną lipidową, oraz umożliwiającą bardziej precyzyjną ocenę swojego stanu wykorzystywanymi metodami.

W związku z tym wykorzystano go do badań biologicznych z udziałem zwierząt. Podczas eksperymentu, prowadzonego przez naukowców Zakładu (na podstawie zgody wyrażonej przez I Lokalną Komisję Etyczną w Lublinie, nr 31/2012, z dnia 15.06.2012 roku, na realizację projektu „Przeciwdrgawkowy i neuroprotektoryjny potencjał wybranych związków z grupy 1,3,4-tiadiazoli w modelach niedotlenienia/niedokrwienia mózgu i ekscytotoksyczności u szczurów”), na szczurach w modelu hipoksji/ischemii normobarycznej (z zastosowaniem trzech kombinacji dawek C7), były pobierane próbki materiału biologicznego (osoczy, serca i nerek), które w ramach niniejszej pracy poddano pomiarom spektroskopowym. Dzięki jego właściwościom fluorescencyjnym, obecność związku C7 udało się potwierdzić we wszystkich trzech rodzajach próbek. Wykazano tym samym, że metoda

spektroskopii fluorescencyjnej może w tym przypadku służyć szybkiej detekcji badanego związku nawet w tak skomplikowanych układach biologicznych oraz, że istotnie posiada on zdolności migrowania przez bariery biologiczne (choć mechanizm migracji nie był tu analizowany). Dalsza analiza spektrometryczna z użycie metody FTIR wykazała istnienie różnic w widmach zwierząt hipoksycznych i kontrolnych, które można było obserwować na poziomie drugich pochodnych widm, choć nie pozwoliła wyselekcjonować spośród nich specyficznego markeru stanu niedotlenienia. Co bardzo ważne, udało się za to wykazać, że zastosowanie związku C7 u badanych zwierząt zmniejszało, lub całkowicie niwelowało efekty wywołane niedotlenieniem, widoczne na poziomie spektralnym. Przedstawione w części poświęconej tym badaniom wyniki, wskazują na cytoprotekcyjne właściwości badanej substancji, szczególnie najniższej zastosowanej dawki.

*Darwinse Klauzgh*