

Streszczenie

Jedną z ważnych, interdyscyplinarnych dziedzin nauki, która dynamicznie rozwija się w ostatnich latach, jest biologia redoks. Ta poddziedzina chemii zajmuje się badaniem procesów utleniania i redukcji składników komórkowych organizmów żywych. W procesy te zaangażowane są reaktywne metabolity tlenu cząsteczkowego określane wspólnym mianem reaktywnych form tlenu i azotu. Wedle dzisiejszej wiedzy, indywidua te biorą udział w przekazywaniu sygnałów biochemicznych, regulacji procesów metabolicznych, a także stanowią istotny element mechanizmu obronnego organizmu. Podczas normalnego funkcjonowania organizmu stężenie tych indywiduów jest utrzymywane na niskim poziomie przez szereg katalitycznych mechanizmów enzymatycznych. Ta delikatna równowaga, określana mianem homeostazy redoks, może jednak zostać zaburzona w wyniku wielu procesów chorobowych, między innymi w przebiegu miażdżycy czy chorób neurodegeneracyjnych jak choroba Alzheimera czy Parkinsona. Dochodzi wtedy do nadprodukcji reaktywnych form tlenu i azotu, które, ze względu na swoją wysoką reaktywność, modyfikują składniki komórki prowadząc do upośledzenia ich funkcjonalności, a przez to do uszkodzenia całej komórki i zaostrzenia procesu chorobowego. Zjawisko to nosi miano stresu oksydacyjnego.

Do bardzo ważnych przedstawicieli reaktywnych form tlenu i azotu należą nadtlenek wodoru i nadtlenoazotyn. Nadtlenek wodoru jest związkiem powstającym w wyniku spontanicznej bądź katalitycznej dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego, posiadającym silne właściwości utleniające. Choć jego reaktywność względem składników komórkowych jest niewielka, w obecności jonów żelaza (II) nadtlenek wodoru może być przekształcony do rodnika hydroksylowego, uznawanego za najbardziej reaktywny rodnik powstający *in vivo*, przez co nadtlenkowi wodoru przypisuje się wysoką toksyczność. Nadtlenoazotyn jest silnym jedno- i dwuelektronowym utleniaczem powstającym *in vivo* w wyniku reakcji anionorodnika ponadtlenkowego z tlenkiem azotu. Nadtlenoazotyn reaguje z wieloma składnikami komórki, w tym z niektórymi aminokwasami, z glutationem czy oksyhemoglobina, ponadto może być prekursorem rodników o silnych właściwościach utleniających i nitrujących jak ditlenek azotu czy anionorodnik węglanowy i dlatego również jest on związkiem o wysokiej toksyczności.

Zbadanie roli reaktywnych form tlenu i azotu, w tym nadtlenku wodoru i nadtlenoazotynu, w funkcjonowaniu organizmów żywych, wymaga posiadania skutecznych

metod ich detekcji. Ze względu na wysoką reaktywność tych indywidualów oraz ich niekorzystne właściwości spektroskopowe, ich bezpośrednia detekcja jest bardzo trudna lub wręcz niemożliwa. Z tego względu do ich detekcji często wykorzystuje się tzw. próbники spektroskopowe, które w wyniku reakcji z wybranymi indywidualami zmieniają swoje właściwości spektroskopowe i/lub fluorescencyjne dając silny sygnał, wykrywalny za pomocą popularnych technik analitycznych. Jednym z takich próbników jest Amplex Red (10-acetylo-3,7-dihydroksyfenoksazyna), który uznawany jest za selektywny próbnik przeznaczony do detekcji nadtlenu wodoru. Próbnik ten używany jest powszechnie w badaniach, jednak mechanistyczne aspekty jego oksydatywnej konwersji w reakcji katalizowanej przez peroksydazę chrzanową (HRP) nie są dobrze poznane.

W rozprawie doktorskiej zatytułowanej „Mechanistyczne aspekty oksydatywnej konwersji próbników przeznaczonych do detekcji nadtlenu wodoru i nadtlenu azotu” przedstawiono kompleksową charakterystykę produktów jednoelektronowego utleniania próbника Amplex Red, wykonane techniką radiolizy impulsowej. Pokazano, iż nie tylko wspomniany układ enzymatyczny H_2O_2 /HRP, ale też silne jednoelektronowe utleniacze, jak rodnik azydowy, ditlenek azotu czy anionorodnik węglanowy, są zdolne do utlenienia próbника Amplex Red. Dla anionorodnika węglanowego oraz rodnika azydowego wyznaczono stałe szybkości reakcji z próbnikiem Amplex Red. Na podstawie sporządzonej charakterystyki zaproponowano mechanizm oksydatywnej konwersji próbника do barwnej rezorufiny, z uwzględnieniem jego własności kwasowo-zasadowych, w którym postuluje się utworzenie rodnika Amplex Red, jego następczą dysproporcjonację z utworzeniem produktu przejściowego, który rozpada się następnie z utworzeniem rezorufiny.

W badaniach wykazano także, że inkubacja próbника Amplex Red z nadtlenu azotem również prowadzi do jego oksydatywnej konwersji do rezorufiny. Na podstawie m.in. analizy kinetycznej badanego układu wykazano, iż próbnik Amplex Red nie jest utleniany przez nadtlenu azot bezpośrednio, a poprzez rodniki, których nadtlenu azot jest prekursorem. Peroksydaza chrzanowa, używana jako katalizator enzymatyczny w reakcji nadtlenu wodoru z Amplex Red, katalizuje również proces utleniania próbника w obecności nadtlenu azotu. Wyznaczono wartości katalitycznych stałych szybkości reakcji próbника Amplex Red w układzie zawierającym peroksydazę chrzanową oraz odpowiednio nadtlenu wodoru lub nadtlenu azot. Obie wartości są do siebie zbliżone, przez co postawiono wniosek, iż badania prowadzone przy udziale próbника Amplex Red, mogą prowadzić nie tylko do wykrywania

nadtlenku wodoru, ale również nadtlenoazotynu. Wykorzystując kwas 7-boronokumarynowy, będący próbnikiem o wysokiej reaktywności względem nadtlenoazotynu i jednocześnie niskiej reaktywności względem nadtlenku wodoru, zaproponowano zastosowanie układu dwóch próbników do rozróżnienia sygnałów analitycznych pochodzących od nadtlenku wodoru i nadtlenoazotynu.

W drugiej części eksperymentalnej omawianej rozprawy doktorskiej przedstawiono wybrane aspekty reaktywności związków boronowych w kontekście ich wykorzystania do detekcji nadtlenoazotynu. Zbadano reaktywność próbnika Peroxy Crimson 1 względem nadtlenoazotynu w zależności od pH, co pozwoliło na wyznaczenie wartości elementarnej stałej szybkości tej reakcji. Zbadano także stabilność próbnika względem glutationu – próbnik Peroxy Crimson ulega szybkiej reakcji przyłączenia jednej lub dwóch cząsteczek glutationu, co wyłącza ten próbnik z użycia w badaniach biologicznych. Próbnik ten wykorzystano jednak do określenia reaktywności trzech innych próbników, będących izomerycznymi kwasami boronowymi podstawionymi ugrupowaniem $-\text{CH}_2\text{P}^+(\text{C}_6\text{H}_5)_3$, względem nadtlenoazotynu, techniką radiolizy impulsowej. Zbadano także profil produktów powstających w reakcji tychże próbników z nadtlenoazotynem. Jeden z nich, próbnik podstawiony w pozycji *orto*-, nazwany *o*-MitoPhB(OH)₂ wykazał odmienny profil produktów od pozostałych próbników, charakteryzujący się obecnością, w dużej ilości, produktu wewnętrznej cyklizacji, jako produktu specyficznego dla reakcji z nadtlenoazotynem.

Wykorzystując próbniiki *o*-MitoPhB(OH)₂ oraz kwas 7-boronokumarynowy, na podstawie szczegółowej analizy profilu produktów reakcji tych próbników w kilku układach badawczych, wykazano, że produktem powstającym w reakcji azanonu (HNO) z tlenem cząsteczkowym, jest nadtlenoazotyn, co było przedmiotem sporu w środowisku naukowym w ostatnich latach.