

Mgr inż. Bartosz Michałowski
Politechnika Łódzka
Wydział Chemiczny
Międzyresortowy Instytut Techniki Radiacyjnej

Łódź, 26.02.2017 r.

Promotor: prof. dr hab. inż. Andrzej Marcinek
Promotor pomocniczy: dr inż. Adama Sikora

Mechanistyczne aspekty detekcji reaktywnych form tlenu i azotu z wykorzystaniem wybranych próbników fluorescencjogennych

Detekcja reaktywnych form tlenu i azotu (RFTiA) w układach biologicznych jest niezwykle trudna ze względu na ich krótki czas życia w środowisku komórkowym wynikający z ich wysokiej reaktywności. W prostych układach chemicznych bezpośrednia detekcja reaktywnych form tlenu i azotu jest możliwa z wykorzystaniem szybkich metod rozdzielczych w czasie, bazujących na pomiarze absorpcji, głównie w zakresie UV, takich jak radioliza impulsowa, czy fotoliza błyskowa. W układach biologicznych najczęściej wykorzystuje się metody pośrednie bazujące na utlenianiu, bądź też redukcji, odpowiednio przygotowanych próbników spektroskopowych. Do najczęściej wykorzystywanych próbników, ze względu na wysoką czułość technik fluorescencyjnych, należą próbniki fluorescencjogenne. Próbniki te w reakcji z określonym indywiduum przekształcane są do związków fluorescencyjnych. Należy pamiętać, iż idealny próbnik spektroskopowy jest przede wszystkim selektywny względem badanego indywiduum. Reaguje bezpośrednio z nim, a na drodze tej reakcji powstaje produkt łatwy w detekcji oraz stabilny chemicznie w warunkach eksperymentu.

W rozprawie doktorskiej zatytułowanej „Mechanistyczne aspekty detekcji reaktywnych form tlenu i azotu z wykorzystaniem próbników fluorescencjogennych” opisano reaktywność próbników przeznaczonych do detekcji anionorodnika nadadtlenkowego ($O_2^{\bullet-}$) oraz tlenku azotu ($^{\bullet}NO$). Przypuszcza się, iż detekcja tych indywiduów z wykorzystaniem próbników spektroskopowych objętych badaniami opisanymi w niniejszej pracy wymaga, tzw. „aktywacji” próbnika w reakcji jednoelektronowego utleniania. Etap ten jest zatem kluczowym elementem definiującym dalszą reaktywność próbnika względem określonego indywiduum.

W pierwszej części pracy, wykorzystując techniki radiolizy impulsowej oraz radiolizy niskotemperaturowych szkliv organicznych, scharakteryzowano produkt jednoelektronowego utleniania hydroetydyny (HE), „złotego standardu” w detekcji $O_2^{\bullet-}$. Badania radiolityczne pozwoliły na pełną charakterystykę produktów jednoelektronowego utleniania tego próbnika oraz pochodnych takich jak benzydyna, metyloetydyna i N,N,N',N'-tetrametylohydroetydyna. Badania uzupełniono o obliczenia kwantowo-mechaniczne z zastosowaniem metody funkcyjałów gęstości zależnej od czasu (TD-DFT). Na podstawie wyliczonych przejść elektronowych potwierdzono, iż główny produktem jednoelektronowego utleniania HE i jej pochodnych w pH 7,4 jest kationorodnik $HE^{\bullet+}$. Dodatkowo, obliczenia pokazały, iż gęstość spinowa w cząsteczce kationorodnika jest ulokowana głównie w pozycji *para* do grupy aminowej znajdującej się w wewnętrznym pierścieniu HE. Stwierdzono, iż wartość gęstości spinowej oraz zawada steryczna w pozycji C-2 będą determinowały zdolność badanego próbnika do addycji $O_2^{\bullet-}$.

Ponadto zbadano reaktywność HE względem biologicznie ważnych utleniaczy takich jak rodniki glutationylowe oraz cysteinyłowe, rodniki dwutlenku azotu oraz anionorodnik węglanowy. Ponieważ reakcja HE z $O_2^{\bullet-}$ jest procesem wolnym i wyznaczenie bezpośrednio stałej szybkości tej reakcji jest trudne ze względu na kilkukrotnie szybszą reakcję dysmutacji $O_2^{\bullet-}$, zaproponowano alternatywną metodę określenia drugorzędowej stałej szybkości tej reakcji, bazując na reaktywności HE względem szeregu rodników chlorometyloperoksyłowych generowanych radiolitycznie.

Przeprowadzone badania dotyczące jednoelektronowego HE oraz mechanizmu jej oksydatywnej konwersji do związku fluorescencyjnego, kationu 2-hydroksyetydyny, przeprowadzone z użyciem techniki chromatografii cieczowej, wskazują, iż procesy jednoelektronowego utleniania HE do $HE^{\bullet+}$ mogą odgrywać istotną rolę w tym mechanizmie, niejako „uczulając” próbnik na $O_2^{\bullet-}$. Ma to istotne znaczenie dla interpretacji wszelkich wyników uzyskanych z wykorzystaniem tego próbnika, bowiem okazuje się, iż zwiększona konwersja HE do 2-OH- E^+ , w obecności peroksydazy chrzanowej, glutationu, czy jonów żelaza (III) nie musi wynikać ze zwiększonej produkcji $O_2^{\bullet-}$, lecz może być skutkiem nasilonego utleniania próbnika do kationorodnika.

Podobne zjawisko może mieć miejsce dla próbników diaminowych wykorzystywanych do detekcji $\cdot\text{NO}$. Stąd, w drugiej części pracy zbadano wpływ $\text{O}_2^{\cdot-}$ na detekcję $\cdot\text{NO}$ z wykorzystaniem próbników diaminowych. Pokazano, iż wydajność procesu N-nitrozowania 2,3-diaminonaftalenu oraz spiro-laktamowej pochodnej rodminy B (RhPDA) zależy od stosunku stężeń $\text{O}_2^{\cdot-}/\cdot\text{NO}$ produkowanych w układzie modelowym. Zbadano wpływ różnych związków niskocząsteczkowych, takich jak glutation, jony azydkowe, czy jony węglanowe na wydajność konwersji tych próbników do fluorescencyjnych produktów.

Barłoz Michałowski

26.02.2017 r.