



UNIWERSYTET GDAŃSKI



WYDZIAŁ CHEMII  
Katedra Chemii Ogólnej i Nieorganicznej



80-308 Gdańsk, ul. Wita Stwosza 63, ☎ (58) 523-50-60, fax. (58) 523-50-12,

✉ dagmara.jacewicz@ug.edu.pl

Gdańsk, 29.01.2015 r.

**Dr Dagmara Jacewicz**

## I. Autoreferat

### 1. Stopnie naukowe

**06/2001**                    **magister chemii**, Wydział Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

**09/2005**                    **doktor nauk chemicznych**, Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, rozprawa doktorska pt. *„Połączenia koordynacyjne Cr(III) typu cis-[Cr(L-L')<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>]<sup>3+</sup> jako modelowe układy do badania kinetyki reakcji wychwytu reagentów gazowych spektrofotometryczną metodą stopped-flow”*, kierownik naukowy: Prof. dr hab. inż. Lech Chmurzyński

### 2. Zatrudnienie w jednostkach naukowych

**2004-2005**                    **asystent**, Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego

**Od 2006**                    **adiunkt**, Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego

**3. Osiągnięcie wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy 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.).**

#### 3.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

*Zastosowanie w układach biologicznych opracowanych i przetestowanych w układach chemicznych nowych metod oznaczania tlenku węgla(IV), nadtlenu wodoru i tlenku azotu(IV)*

### 3.2. Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe (wraz z IF, liczbą cytowań i oświadczeniami autora).

**H1.** D. Jacewicz, A. Łapińska, A. Dąbrowska, A. Figarski, M. Woźniak, L. Chmurzyński, "Reactions of NO<sub>2</sub> with chromium(III) complexes with histamine and pyridoxamine ligands studied by the stopped-flow technique", *Analytical Biochemistry*, 350, 256-262 (2006).

IF<sub>2006</sub> = 2.948      IF<sub>2008-2012</sub> = 3,034      Liczba cytowań: 6

*Byłam pomysłodawcą tych badań. Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu badań, zsyntezowaniu związków koordynacyjnych chromu(III) z pirydoksamina oraz histaminą jako ligandem biologicznie czynnym, opracowaniu i interpretacji otrzymanych danych fizykochemicznych oraz przygotowaniu manuskryptu publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 60%.*

**H2.** D. Jacewicz, A. Chylewska, A. Dąbrowska, L. Chmurzyński, "Stopped-flow spectrophotometric study on the reaction between carbon dioxide and [Co(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>3+</sup> ion in aqueous solution", *Zeitschrift fur anorganische und allgemeine Chemie (ZAAC)*, 633, 1494-1499 (2007).

IF<sub>2007</sub> = 1,26      IF<sub>2008-2012</sub> = 1,197      Liczba cytowań: 3

*Byłam pomysłodawcą tych badań. Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu badań, zsyntezowaniu związku koordynacyjnego kobaltu(III), przeprowadzeniu badań kinetycznych, opracowaniu i interpretacji otrzymanych danych fizykochemicznych oraz przygotowaniu manuskryptu publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 60%.*

**H3.** D. Jacewicz, A. Chylewska A. Dąbrowska, L. Chmurzyński, "Acid-catalysed hydrolysis of *cis*-[Cr(C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)(AaraNH<sub>2</sub>)(OH<sub>2</sub>)(OSO<sub>2</sub>)]<sup>-</sup> (where AaraNH<sub>2</sub> denotes methyl 3-amino-2,3-dideoxy- $\alpha$ ,D-arabino-hexopyranoside)", *Transition Metal Chemistry*, 32, 1030-1034 (2007).

IF<sub>2007</sub> = 0,838      IF<sub>2008-2012</sub> = 1,118      Liczba cytowań: 1

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zsyntezowaniu związku koordynacyjnego chromu(III) z aminocukrem jako ligandem biologicznie czynnym, opracowaniu i interpretacji otrzymanych danych fizykochemicznych oraz przygotowaniu części manuskryptu do publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 30%.*

**H4.** D. Jacewicz, A. Chylewska, A. Dąbrowska, L. Chmurzyński, "Kinetics and the mechanism of formation and acid-catalyzed decomposition of [Co(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>CO<sub>3</sub>]<sup>+</sup> complex cation in aqueous solution", *Zeitschrift fur anorganische und allgemeine Chemie (ZAAC)*, 634, 137-141 (2008).

IF<sub>2008</sub> = 1,102      IF<sub>2008-2012</sub> = 1,197      Liczba cytowań: 1

*Byłam pomysłodawcą tych badań. Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu badań, zsyntezowaniu związku koordynacyjnego kobaltu(III), przeprowadzeniu badań kinetycznych, opracowaniu i interpretacji otrzymanych danych*

fizykochemicznych oraz przygotowaniu manuskryptu publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 60%.

- H5.** D. Jacewicz, M. Szkatuła, A. Chylewska, A. Dąbrowska, M. Woźniak, L. Chmurzyński, "Coordinate  $cis$ -[Cr(C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)(pm)(OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sup>+</sup> cation as molecular biosensor of pyruvate's protective activity against hydrogen peroxide mediated cytotoxicity", *Sensors*, 8, 4487-4504 (2008).

IF<sub>2008</sub> = 1,070      IF<sub>2008-2012</sub> = 1,671      Liczba cytowań: 5

*Byłam pomysłodawcą tych badań. Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu badań, zsyntezowaniu związku koordynacyjnego chromu(III) z pirydoksaminą jako ligandem biologicznie czynnym, opracowaniu i interpretacji otrzymanych danych fizykochemicznych oraz przygotowaniu manuskryptu publikacji z części chemicznej. Mój udział procentowy szacuję na 60%.*

- H6.** A. Dąbrowska, D. Jacewicz, A. Chylewska, M. Szkatuła, N. Knapp, J. Kubasik-Juraniec, M. Woźniak, L. Chmurzyński, "Nitric Dioxide as biologically Important Radical and its Role in the Molecular Mechanisms of Pancreatic Inflammation", *Current Pharmaceutical Analysis*, 4, 183-196 (2008).

IF<sub>2008</sub> = 1,033      IF<sub>2008-2012</sub> = 1,279      Liczba cytowań: 6

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zebraniu literatury dotyczącej tlenku azotu(IV) jako rodnika i napisaniu 2 podrozdziałów z tego materiału. Mój udział procentowy szacuję na 20%.*

- H7.** D. Jacewicz, A. Dąbrowska, D. Wyrzykowski, J. Pranczk, M. Woźniak, J. Kubasik-Juraniec, N. Knap, K. Siedlecka, A.J. Neuwelt, L. Chmurzyński, "A Novel Biosensor for Evaluation of Apoptotic or Necrotic Effects of Nitrogen Dioxide during Acute Pancreatitis in Rat", *Sensors*, 10, 280-291 (2010).

IF<sub>2010</sub> = 1,774      IF<sub>2008-2012</sub> = 1,671      Liczba cytowań: 6

*Byłam pomysłodawcą tych badań. Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu badań, zsyntezowaniu związku koordynacyjnego chromu(III) z pirydoksaminą jako ligandem biologicznie czynnym, opracowaniu i interpretacji otrzymanych danych fizykochemicznych oraz przygotowaniu manuskryptu publikacji z części chemicznej. Mój udział procentowy szacuję na 50%.*

- H8.** D. Jacewicz, A. Dąbrowska, L. Chmurzyński "Kinetic studies of aquation reaction of oxalato ligands in coordination complex ions of [Cr(C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(L-L)]<sup>-</sup> and [Cr(C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)(L-L)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>+</sup> type induced by Fe<sup>3+</sup> ions", *Journal of Coordination Chemistry*, 64, 2834-2847 (2011).

IF<sub>2011</sub> = 1,547      IF<sub>2008-2012</sub> = 1,369      Liczba cytowań: 0

*Byłam pomysłodawcą tych badań. Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu badań, zsyntezowaniu związków koordynacyjnych chromu(III) z aminocukrami jako ligandami biologicznie czynnymi, wykonaniu badań kinetycznych,*

*opracowaniu i interpretacji otrzymanych danych fizykochemicznych oraz przygotowaniu manuskryptu publikacji z części chemicznej. Mój udział procentowy szacuję na 60%.*

- H9. D. Jacewicz, D. Wyrzykowski, K. Żamojć, D. Czerwińska, P. Czaja, L. Chmurzyński,** "Thermal properties of potassium bis(oxalato)diaquochromates(III) in solid state. Trans-cis isomerization of the  $[\text{Cr}(\text{C}_2\text{O}_4)_2(\text{OH}_2)_2]^-$  complex ion in aqueous solutions", *Structural Chemistry*, 23, 333-340 (2012).

IF<sub>2012</sub> = 1,772      IF<sub>2008-2012</sub> = 1,673      Liczba cytowań: 4

*Byłam pomysłodawcą tych badań. Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu badań, zsyntezowaniu związku koordynacyjnego chromu(III), opracowaniu i interpretacji otrzymanych danych fizykochemicznych oraz przygotowaniu manuskryptu do publikacji z części chemicznej. Mój udział procentowy szacuję na 50%.*

- H10. D. Jacewicz, K. Żamojć, L. Chmurzyński;** "Analytical methods for determination of NO and NO<sub>2</sub> and their applicability in biological studies" *Current Pharmaceutical Analysis*, 8, 115-134 (2012).

IF<sub>2012</sub> = 1,333      IF<sub>2008-2012</sub> = 1,279      Liczba cytowań: 0

*Byłam pomysłodawcą tej pracy. Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zebraniu literatury dotyczącej metod oznaczania tlenku azotu(IV) i tlenku azotu(II) oraz znaczącego udziału w napisaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 60%.*

- H11. D. Jacewicz, K. Żamojć, D. Wyrzykowski, L. Chmurzyński;** "Analytical methods for determination of CO and CO<sub>2</sub> and their applicability in biological studies" *Current Pharmaceutical Analysis*, 9, 226-235 (2013).

IF<sub>2013</sub> = 0,771      IF<sub>2008-2012</sub> = 1,279      Liczba cytowań: 2

*Byłam pomysłodawcą tej pracy. Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zebraniu literatury dotyczącej metod oznaczania tlenku węgla(IV) i tlenku węgla(II) oraz znaczącym udziale w napisaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 60%.*

- H12. D. Jacewicz, K. Siedlecka-Kroplewska, J. Pranczk, U. Popowska, A. Kuban-Jankowska, N. Knap, D. Wyrzykowski, K. Żamojć, M. Woźniak, L. Chmurzyński,** "Protective effect of  $\alpha$ -ketobutyrate on survival of hippocampal neurons challenged with hydrogen peroxide chemistry mimicking brain ischemia", *Current Pharmaceutical Analysis*, 10, 87-91 (2014).

IF<sub>2013</sub> = 0,771      IF<sub>2008-2012</sub> = 1,279      Liczba cytowań: 0

*Byłam pomysłodawcą tych badań. Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu badań, a następnie na zsyntezowaniu związku koordynacyjnego chromu(III), opracowaniu i interpretacji otrzymanych danych fizykochemicznych oraz przygotowaniu manuskryptu publikacji z części chemicznej. Mój udział procentowy szacuję na 30%.*

**H13. D. Jacewicz**, K. Siedlecka-Kroplewska, J. Pranczk, D. Wyrzykowski, M. Woźniak, L. Chmurzyński, "Coordination *cis*-[Cr(C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)(pm)(OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sup>+</sup> ion as a specific molecular biosensor in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detection in HT22 cells", *Molecules*, 19(6), 8533-8543 (2014).

IF<sub>2013</sub> = 2,095      IF<sub>2008-2012</sub> = 1,958      Liczba cytowań: 0

*Byłam pomysłodawcą tych badań. Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu badań, zsyntezowaniu związku koordynacyjnego chromu(III), opracowaniu i interpretacji otrzymanych danych fizykochemicznych oraz przygotowaniu manuskryptu publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 50%.*

**H14. D. Jacewicz**, J. Pranczk, D. Wyrzykowski, K. Żamojć, D. Czerwińska, L. Chmurzyński, "Thermal properties of [Co(en)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]Cl in solid state. Cis-trans isomerization of the [Co(en)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> complex ion in methanol", *Reaction Kinetics Mechanisms And Catalysis*, 113, 321–331, (2014).

IF<sub>2013</sub> = 0,983      IF<sub>2011-2012</sub> = 0,967      Liczba cytowań: 0

*Byłam pomysłodawcą tych badań. Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu badań, opracowaniu i interpretacji otrzymanych danych kinetycznych oraz przygotowaniu manuskryptu publikacji z części dotyczącej kinetyki chemicznej. Mój udział procentowy szacuję na 50%.*

**H15. D. Jacewicz**, J. Pranczk, D. Wyrzykowski, K. Żamojć and L. Chmurzyński, "Trans-cis isomerization of the [(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>P]<sub>2</sub>PtCl<sub>2</sub> complex in dimethylformamide solutions", *Journal of Molecular Structure*, 1075, 620-624 (2014).

IF<sub>2013</sub> = 1,599      IF<sub>2008-2012</sub> = 1,556      Liczba cytowań: 0

*Byłam pomysłodawcą tych badań. Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu badań, opracowaniu i interpretacji otrzymanych danych fizykochemicznych oraz przygotowaniu manuskryptu do publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 50%.*

**H16. J. Pranczk, D. Jacewicz**, D. Wyrzykowski, L. Chmurzyński, "Analytical methods for determination of reactive oxygen species", *Current Pharmaceutical Analysis*, 10(4), 293-304 (2014).

IF<sub>2012</sub> = 0,771      IF<sub>2008-2012</sub> = 1,279      Liczba cytowań: 0

*Byłam pomysłodawcą tej pracy. Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na napisaniu części publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 30%.*

#### **Publikacja spoza listy filadelfijskiej**

**H17. D. Jacewicz**, L. Chmurzyński "The application of spectrophotometric stopped-flow method in studies of gas uptake reaction mechanism", *Global Journal of Physical Chemistry*, 2, 302-323 (2011).

*Byłam pomysłodawcą tej pracy. Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zebraniu literatury dotyczącej metod oznaczania gazów oraz napisaniu części manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 50%.*

**Sumaryczny IF dla 16 publikacji:**

IF (impact factor) publikacji naukowych według listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **24,33**

- pięcioletni (2008-2012) IF (impact factor) publikacji naukowych według listy Journal Citation Reports (JCR) wynosi **23,81**

**Sumaryczna liczba cytowań dla 16 publikacji wynosi: 34**

<sup>b</sup>Dane z Web of Science z dnia 14.01.2015

**Indeks Hirscha: 6**

W 13 publikacjach, które wchodzi w skład rozprawy habilitacyjnej (razem 17 prac), **jestem autorem korespondencyjnym**, a w 14 pracach **autorem pierwszym**.

**3.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania****3.3.1. Cel naukowy podjętych badań**

W ostatniej dekadzie XX w. wzrosło zainteresowanie badaniami dotyczącymi oddziaływań jonów metali przejściowych z substancjami wchodzącymi w skład komórki [1-3]. Wiele publikacji naukowych poszerzyło wiedzę na temat metabolizmów jonów metali przejściowych w aspekcie biochemicznym i toksykologicznym [4], jak również, choć w znacznie mniejszym stopniu, bionieorganicznym [5]. Jednym z jonów metali zasługujących na szczególną uwagę jest jon  $\text{Cr}^{3+}$ . Udowodniono, że jego niedobór powoduje zaburzenia tolerancji glukozy, a związek zawierający jon Cr(III) wpływa dodatnio na terapeutyczne działanie insuliny i nazwano go czynnikiem tolerancji glukozy GTF [6, 7].

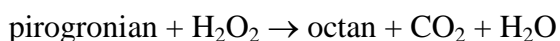
W trakcie realizacji badań, w jego pierwszym etapie, zamierałam otrzymać inertne związki koordynacyjne, zawierające w centrum koordynacji jony  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{3+}$  oraz  $\text{Pt}^{2+}$  z biologicznie czynnymi ligandami organicznymi oraz innymi pomocniczymi ligandami organicznymi i nieorganicznymi. Pomiar kinetyczne z wykorzystaniem inertnych związków koordynacyjnych mogą zostać wykorzystane do badania procesów biologicznych, a reakcje z ich udziałem stanowiąc mogą modele reakcji enzymatycznych biegnących w układach biologicznych. Z kolei badania nad układami modelowymi zawierającymi układ metal – biologicznie czynny ligand mogą dostarczyć odpowiedzi na pytanie, w jakim stopniu wiązanie z bioligandem modyfikuje reaktywność chemiczną badanych układów w odniesieniu do ich funkcji biologicznych.

W następnym etapie, zamierałam przeanalizować aktualne metodologie stosowane do oznaczania nadtlenu wodoru i tlenku azotu(IV) w układach biologicznych i kolejno,

opracować nowe, biochemiczne i fizykochemiczne sposoby oznaczania tych indywidualności chemicznych, kładąc szczególny nacisk na obniżenie kosztów oraz uproszczenie procedur metodologicznych.

Istotnym elementem moich badań było wyselekcjonowanie z przebadanej grupy związków tych, które mogą być wykorzystane jako czułe biosensory molekularne do oznaczania reaktywnych form tlenu i azotu, ze szczególnym uwzględnieniem nadtlenu wodoru. Badania te miały doprowadzić do ustalenia kryteriów jakie muszą być spełnione, aby rozwiązać problem oznaczania reaktywnych form tlenu i azotu w układach biologicznych na różnych poziomach organizacji i trudności.

Jednym z moich osiągnięć naukowych było zastosowanie w układach biologicznych metod oznaczania tlenku węgla(IV), nadtlenu wodoru i tlenku azotu(IV), które przetestowałam wcześniej na układach chemicznych. W metodzie oznaczania tlenku węgla(IV) wykorzystałam m. in. pirogronian, który jest bezpośrednim źródłem CO<sub>2</sub>, co można zobrazować poniższym równaniem reakcji:



Jak wynika z powyższej reakcji stosunek stechiometryczny tlenku węgla (IV) do nadtlenu wodoru jest jak 1:1 zatem obliczona ilość CO<sub>2</sub> jest równoważna ilości nadtlenu wodoru, który znajduje się w badanym układzie. Zatem stosując tę metodę oznaczam w sposób ilościowy bezpośrednio tlenek węgla(VI) oraz pośrednio nadtlenek wodoru.

Z kolei w metodzie oznaczania tlenku azotu(IV) w modelu chemicznym, rodnik NO<sub>2</sub> generowany był m. in. z SIN-1, jako bezpośredniego źródła  $\cdot\text{NO}_2$ . Użycie akurat tego reagenta umożliwiło zbliżenie warunków eksperymentu do warunków generowania  $\cdot\text{NO}_2$  w układach biologicznych.

Szczególną uwagę poświęciłam na opracowanie i przetestowanie metody pozwalającej na oznaczenie nadtlenu wodoru generowanego w trakcie sygnalizacji komórkowej (działanie czynników wzrostu) i w mechanizmach patofizjologii komórki, np. apoptoza, nekroza, ostry i przewlekły stan zapalny. Metoda ta została wykorzystywana do oceny udziału H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w sygnalizacji komórkowej. Komórki poddane działaniu czynników wzrostu generują stres oksydacyjny pod wpływem endogennie generowanego nadtlenu wodoru. Podkreślić należy, że do chwili obecnej nie udało się jednoznacznie opracować metody ilościowego oznaczania H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w komórkach.

Cel aplikacyjny moich badań polegał na:

- 1) opracowaniu nowej, metody oznaczania nadtlenu wodoru użytecznej do określenia

- roli tej reaktywnej formy tlenu w schorzeniach neurodegeneracyjnych (zwierzęce modele ALS) myszy wykazujących przyspieszony proces starzenia (SAM),
- 2) wykorzystanie opracowanej metody do oceny ilości nadtlenu wodoru w strukturze hipokampa myszy ulegających przyspieszonemu starzeniu (SAM),
  - 3) wyselekcjonowanie za pomocą powyższej metody  $\alpha$ -ketokwasu działającego najefektywniej *in vivo*,
  - 4) opracowaniu nowej, metody oznaczania rodnika tlenu azotu(IV), którą zastosowano w badaniach biologicznych.

### 3.3.2. Najważniejsze wyniki

#### 3.3.2.1 Metody oznaczania reaktywnych form tlenu i azotu

Stres oksydacyjny i nitrozacyjny towarzyszy naturalnym procesom fizjologicznym, takim jak lignifikacja czy starzenie się komórek. Najczęściej jednak wywoływany jest pod wpływem różnych czynników biotycznych i abiotycznych, powodując zachwianie równowagi między wytwarzaniem reaktywnych form tlenu (ROS) i azotu (RNS) a ich usuwaniem poprzez odpowiednie systemy antyoksydacyjne. Do podstawowych reaktywnych form tlenu należą: nadtlenuk wodoru ( $H_2O_2$ ), anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^{\cdot-}$ ) oraz rodnik hydroksylowy, zaś do reaktywnych form azotu: tlenek azotu(II), tlenek azotu(IV) oraz anion nadtlenoazotanowy(III) [8-10]. Toksyczność ROS i RNS w komórkach wynika z ich ogromnej reaktywności z różnymi składnikami komórki takimi jak: lipidy, białka (w tym enzymy), kwasy nukleinowe i cukry. Prowadzi to do wielu uszkodzeń w obrębie komórki (oksydacja lipidów, inaktywacja enzymów, białek transportujących, receptorów i kanałów jonowych, uszkodzenie struktury kwasów nukleinowych, depolimeryzacja polisacharydów) [11-14]. Stres oksydacyjny oprócz wyżej opisanego wpływu na organizm człowieka ma również negatywne znaczenie dla roślin: stymuluje opadanie liści, hamuje rozwój chloroplastów, ogranicza wzrost korzeni, zmniejsza żywotność nasion i zwiększa częstość występowania nieprawidłowego wzrostu.

Metodologia dotycząca ilościowego oznaczania tlenu azotu(II)<sup>H10, H17</sup> w materiałach biologicznych rozwija się stosunkowo szybko, jednak metody stosowane do tej pory nie są doskonałe. W literaturze naukowej obserwuje się polemikę poszczególnych grup badawczych na temat metod oznaczania tlenu azotu(II) w materiale biologicznym. Naukowcy szukają coraz to nowych rozwiązań, które zapewniają bardziej czułe i specyficzne metody oznaczania



stężenia tlenku azotu(II) w układach biologicznym. Większość badań biomedycznych z udziałem tlenku azotu(II) prowadzi się w warunkach *in vitro*.

Z kolei identyfikacja tlenku azotu(IV) ( $\cdot\text{NO}_2$ ) jako biologicznie aktywnej cząsteczki ma ogromne implikacje w badaniu chemii utleniającego stresu komórkowego. Powoduje go wzajemna reakcja silnych utleniaczy  $\cdot\text{NO}$  i anionorodnika nadtlenowego ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) prowadząca do powstania anionu nadtlenoazotanowego(III)  $\text{OONO}^-$  na drodze dyfuzji. Jego sprzężony kwas ( $\text{pK}_a \sim 7$ ) ulega gwałtownie dysocjacji, która prowadzi do otrzymania tlenku azotu(IV) i rodnika hydroksylowego. Anion nadtlenoazotanowy(III) reaguje alternatywnie z  $\text{CO}_2$  prowadząc szybko do utworzenia  $\cdot\text{NO}_2$  i rodnika węglanowego. Inną możliwą drogą wytwarzania ( $\cdot\text{NO}_2$ ) są enzymatyczne reakcje przy udziale peroksydazy katalizującej utlenianie anionów azotanowych(III) [15-16]. Podczas gdy powstawanie  $\cdot\text{NO}_2$  z  $\cdot\text{NO}$  i  $\text{O}_2^{\cdot-}$  jest często z biologicznego punktu widzenia nieznacznie ilościowo, to jego zwiększone wydzielanie w warstwach lipidowych lub w domenach białek hydrofobowych stanowi dodatkową drogę wytwarzania  $\cdot\text{NO}_2$  [17].

Pomimo faktu, że powstawanie biologiczne i reakcje, jakim ulega anion nadtlenoazotanowy(III) są faworyzowane kinetycznie i termodynamicznie, to jednak detekcja tego anionu w układach biologicznych jest bardzo utrudniona, m.in. z powodu:

- natury anionu nadtlenoazotanowego(III), która wyklucza jego bezpośrednie wyodrębnianie i wykrywanie,
- konieczności znalezienia detektora innych cząstek, skutecznie konkurujących w reakcjach, jakim ulega również anion nadtlenoazotanowy(III),
- trudności w odróżnieniu biologicznych skutków działania anionu nadtlenoazotanowego(III) od jego prekursorów  $\cdot\text{NO}$  i  $\text{O}_2^{\cdot-}$  czy innych utleniaczy, pochodnych  $\cdot\text{NO}$ .

Ostatnie badania jednakże poddają w wątpliwość znaczącą rolę anionu nadtlenoazotanowego(III) w reakcjach nitrowania. Sugerują one inny mechanizm powstawania 3-nitrotyrozyny w miejscach zapalnych. Polega on na utlenianiu  $\text{NO}_2^-$  za pomocą peroksydazy do silnego utleniacza  $\cdot\text{NO}_2$ . Tak więc anion azotanowy(III) uważany za końcowy i inertny produkt metabolizmu  $\cdot\text{NO}$  może uzyskiwać właściwości cytotoksyczne w obecności mieloperoksydazy, enzymu występującego obficie i wydzielanego z komórek fagocytujących [18].

Udział tlenków azotu w procesach biochemicznych zachodzących w naszych organizmach jest znaczący. Z tego względu potrzebne są metody, dzięki którym możliwe

będzie oznaczenie tych tlenków w naszych organizmach. W literaturze opisane są metody oznaczania tlenków azotu, dzięki którym można wykryć te gazy bezpośrednio albo pośrednio w materiale biologicznym. Jednakże należy zauważyć, że jakościowe i ilościowe pomiary NO i NO<sub>2</sub> w układach biologicznych są bardzo skomplikowane. Wynika to przede wszystkim z ich wysokiej reaktywności. W Tabeli 1 zebrałam i porównałam informacje na temat najczęściej używanych metod oznaczania tlenków azotu, co zostało opisane przeze mnie w pracach przeglądowych<sup>H10, H17, H6</sup>.

**Tabela 1.** Metody ilościowego oznaczania NO and NO<sub>2</sub>

Metoda	Maksymalne stężenie [mol/l]	Zakres zależności liniowej [mol/l]
Chromatografia i elektroforeza kapilarna jonów: NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> i NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	$> 10^{-7}$ NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0 – 50 · 10 <sup>-6</sup> NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> 0 – 400 · 10 <sup>-6</sup> NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
Metoda chemiluminescencyjna	$\approx 10^{-9}$ NO	$\approx 10^{-9} - 10^{-2}$ NO
Metoda EPR	$\approx 10^{-6}$ HbNO	2 · 10 <sup>-6</sup> – 1 HbNO
Metoda Griessa	$> 10^{-7}$ NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	$> 5 \cdot 10^{-6}$ NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
Metody elektrochemiczne	$\approx 10^{-9} - 10^{-8}$ NO	$\approx 10^{-9}/10^{-8} - 10^{-5}$ NO
Oznaczenie cGMP	$\approx 10^{-9}$ NO	5 – 80 · 10 <sup>-9</sup> cGMP
Oznaczenie L-cytruliny	$\approx 10^{-9}$ L-cyt	$> 5 \cdot 10^{-12}$ mol L-cyt/mg tkanki/ min
Metoda chemiluminescencyjna	$\approx 10^{-9}$ NO <sub>2</sub>	$\approx 10^{-9} - 10^{-2}$ NO <sub>2</sub>
Metoda zatrzymanego przepływu stopped-flow	$> 10^{-7}$ NO <sub>2</sub>	$\approx 10^{-7} - 10^{-2}$ NO <sub>2</sub>

Z kolei metody dotyczące oznaczania reaktywnych form tlenu takich jak: anionorodnik ponadtlenkowy/rodnik ponadtlenkowy, nadtlenek wodoru, tlen singletowy oraz rodnik wodorotlenkowy zostały opisane przeze mnie w pracy przeglądowej oznaczonej numerem<sup>H16</sup>. Główne zalety i wady sposobów wykrywania reaktywnych form tlenu zestawiałam w Tabeli 2.

**Tabela 2.** Podstawowe metody oznaczania reaktywnych form tlenu

Metoda	Zalety	Wady
Spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR)	Dostarcza informacji na temat przestrzennego rozkładu wolnych rodników w próbce, bada możliwe wolne rodniki w substancji czynnej biologicznie	Nieczuła na próbki zawierające duże ilości wody, duże stężenie pułapek spinowych
Jądrowy rezonans magnetyczny (NMR)	Grupa sygnałów ( lub jeden sygnał) charakterystyczna tylko dla jednego jądra w cząsteczce	Niska czułość, stosunkowo duża ilość próbki
Chromatografia gazowa (GC)	Wysoka rozdzielczość, mała ilość próbki	Ograniczona pojemność pików – w przypadku skomplikowanych próbek
Chemiluminescencja (CL)	Wysoka czułość	Zależność od pH
Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC-UV)	Możliwość wykrywania rozdzielonych substancji , analiza jakościowa i ilościowa, łatwy w stosowaniu gradientów	Próbki muszą wykazywać absorpcję w ultrafiolecie
Fluorescencja (FL)	Wysoka czułość i selektywność	Bardzo wrażliwa na środowisko
Elektroforeza kapilarna	Krótki czas analizy, wysoka wydajność i selektywność, analiza związków niezależna od masy cząsteczkowej	Słaba odporność mechaniczna żeli, trudności z utrwalaniem żeli

Niektóre z metod wykrywania ROS są także stosowane w celu określenia aktywności przeciwutleniających różnych substancji. W celu określenia działania substancji chemicznych jako potencjalnych przeciwutleniaczy można stosować metody alkalicznego DMSO i metodę redukcji DPPH (rodnik 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyl).

### 3.3.2.2 Metody oznaczania tlenku węgla(II) i tlenku węgla(IV)

Pomimo wielu znanych metod oznaczania tlenku węgla(II) i ditlenku węgla w materiale biologicznym, wciąż nie ma takich technik, które nie miałyby wad. Określanie stężenia tlenków węgla w próbkach biologicznych jest bardzo istotne z punktu widzenia życia ludzi na ziemi, dlatego też naukowcy szukają coraz to lepszych i tańszych rozwiązań dotyczących oznaczania tych gazów. W tabelach 3 i 4 zestawiałam zalety i wady metod, które są najczęściej używane w oznaczaniu CO (Tabela 3) i CO<sub>2</sub> (Tabela 4).<sup>H11</sup>

**Tabela 3.** Zalety i wady metod oznaczania CO w materiale biologicznym

<b>Metoda</b>	<b>Zalety</b>	<b>Wady</b>
Chromatografia gazowa	1) Nieczuła na chemiczne i spektralne interferencje 2) Precyzyjna i bardzo czuła (granica wykrywalności 0,005%) 3) Mała objętość próbki	1) Wymaga uważnego i bardzo dokładnego przygotowania próbki 2) Znacznie wyższy koszt analizy– mało przydatna do rutynowych, szybkich analiz 3) Pochodne hemoglobiny trzeba oznaczyć przy użyciu innych metod
Spektroskopia absorpcyjna	1) Łatwe i szybkie przygotowanie próbki do analizy 2) Krótki czas analizy 3) Akceptowana dla potrzeb toksykologii sądowej czułość (granica wykrywalności 1%) 4) Dają możliwość równoległego pomiaru innych pochodnych hemoglobiny	1) Czułe na spektralne i chemiczne interferencje 2) Mało dokładne w przypadku niskich stężeń (< 5% COHb) 3) Preferowana czysta, świeża krew
Metoda kalorymetryczna	1) Bardzo szybki pomiar 2) Nie przeszkadzają pigmenty obecne w krwi 3) Łatwy w użyciu i powszechnie dostępny sprzęt 4) Małe ilości próbki	1) Brak dokładności pomiaru z powodu reakcji pomiędzy palladem i tlenem
Metoda strąceniowa	1) Wysoka precyzja i dokładność	1) Wpływ pH i stężenia buforu na efekt wytrącania osadu 2) Preferowana czysta, świeża krew
Spektroskopia w podczerwieni	1) Wysoka dokładność oznaczeń 2) Nie przeszkadzają w oznaczeniu inne gazy	1) Wymagana kalibracja na podstawie sporządzonych mieszanin gazowych zawierających znane stężenia ditlenku węgla

**Tabela 4.** Zalety i wady metod oznaczania CO<sub>2</sub> w materiale biologicznym

Metoda	Zalety	Wady
Metoda chemiluminescencyjna	1) Można określić ilościowo stężenie CO <sub>2</sub> w oddechu człowieka 2) Szybka i prosta 3) Możliwość oznaczenia niskich i wysokich stężeń CO <sub>2</sub>	1) Wpływ pH na obserwowane sygnały chemiluminescencyjne 2) W oznaczeniu przeszkadzają jony: bromkowe i węglanowe 3) Słaba selektywność i czułość
Metoda elektrochemiczna	1) Szybki czas reakcji (około 10 sekund) w przypadku zmian stężeń CO <sub>2</sub> w roztworze 2) Szybka i prosta 3) Niskie koszty oznaczeń	1) Zmienne ciśnienie osmotyczne roztworu spowodowane obecnością w roztworze soli 2) W oznaczeniu przeszkadzają inne gazy 3) Długi czas oczekiwania na wynik
Metoda enzymatyczna	1) Bardzo małe ilości surowicy potrzebne do analizy (około 10 ul)	2) Wąski zakres oznaczeń CO <sub>2</sub> (8-65 mmol /l)
Metody miareczkowe	1) Szybka i czuła (można oznaczyć 0,0001% CO <sub>2</sub> )	1) Próbkę nie może zawierać jonów: żelaza(III) i glinu 2) Punkty końcowe miareczkowania nie są zawsze ostre
Metoda manometryczna i wolumetryczna	1) Szeroki zakres oznaczania CO <sub>2</sub>	1) Wysoki koszt analizy 2) Stosunkowo długi czas pomiaru
Metoda stopped-flow	1) Wysoka czułość 2) Mikrometoda (bardzo małe ilości próbki potrzebne są do analizy) 3) Pomiar prowadzony w warunkach beztlenowych	1) Granica pomiaru stężenia > 10 <sup>-7</sup> M CO <sub>2</sub>

### 3.3.2.3 Badania chemiczne

W pierwszej kolejności zsyntezowałam następujące związki koordynacyjne:

- typu  $cis-[Cr(C_2O_4)(L-L)(OH_2)_2]^+$ ,  $cis-[Cr(C_2O_4)(L-L)(OCO_2)]^-$  gdzie L-L' oznacza pochodne witaminy B<sub>6</sub> (pirydoksaminy (pm), pirydoksal (pl), pirydoksynę (pn), histaminę (hm), 1,10-fenantrolinę (phen) i 2,2-bipirydyli (bpy), oraz izomeryczne pochodne 3-amino-2,3-dideoksyheksopiranozydów tzn. 3-amino-2,3-dideoksy-λ-D-arabino-heksopiranozyd metylu (AaraNH<sub>2</sub>) i 3-amino-2,3-dideoksy-β-D-arabino-heksopiranozyd metylu (BaraNH<sub>2</sub>)
- $[Co(NH_3)_4(H_2O)_2]^{3+}$ ,  $[Co(NH_3)_4CO_3]^+$ ,  $[Co(en)_2Cl_2]^+$ , gdzie en oznacza etylenodiaminę
- $trans/cis-[(C_6H_5)_3P]_2PtCl_2$ .

Do oczyszczenia otrzymanych związków koordynacyjnych zastosowałam metodę chromatografii kolumnowej. Otrzymane połączenia koordynacyjne scharakteryzowałam pod kątem:

- składu (metodą analizy elementarnej)
- stechiometrii (metody spektroskopowe UV-Vis wyznaczania stosunku metal/ligand organiczny: metoda nasycenia, metoda nachyleń prostych)
- struktury kompleksu i jego zachowania względem zmian środowiska, w którym się znajduje (pH, rozpuszczalniki) w stanie podstawowym oraz po protonowaniu i deprotonowaniu (metodami analizy spektroskopowej UV-Vis)
- właściwości kwasowo-zasadowych połączeń koordynacyjnych - na podstawie dwóch niezależnych, mikro-ilościowych metod miareczkowania potencjometrycznego i pH-metryczno-spektroskopowego zastosowanych w celu wyznaczenia wartości  $pK_a$
- wyznaczenia charakterystyk termicznych przy zastosowaniu metod TG-FTIR, TG-DSC-MS.

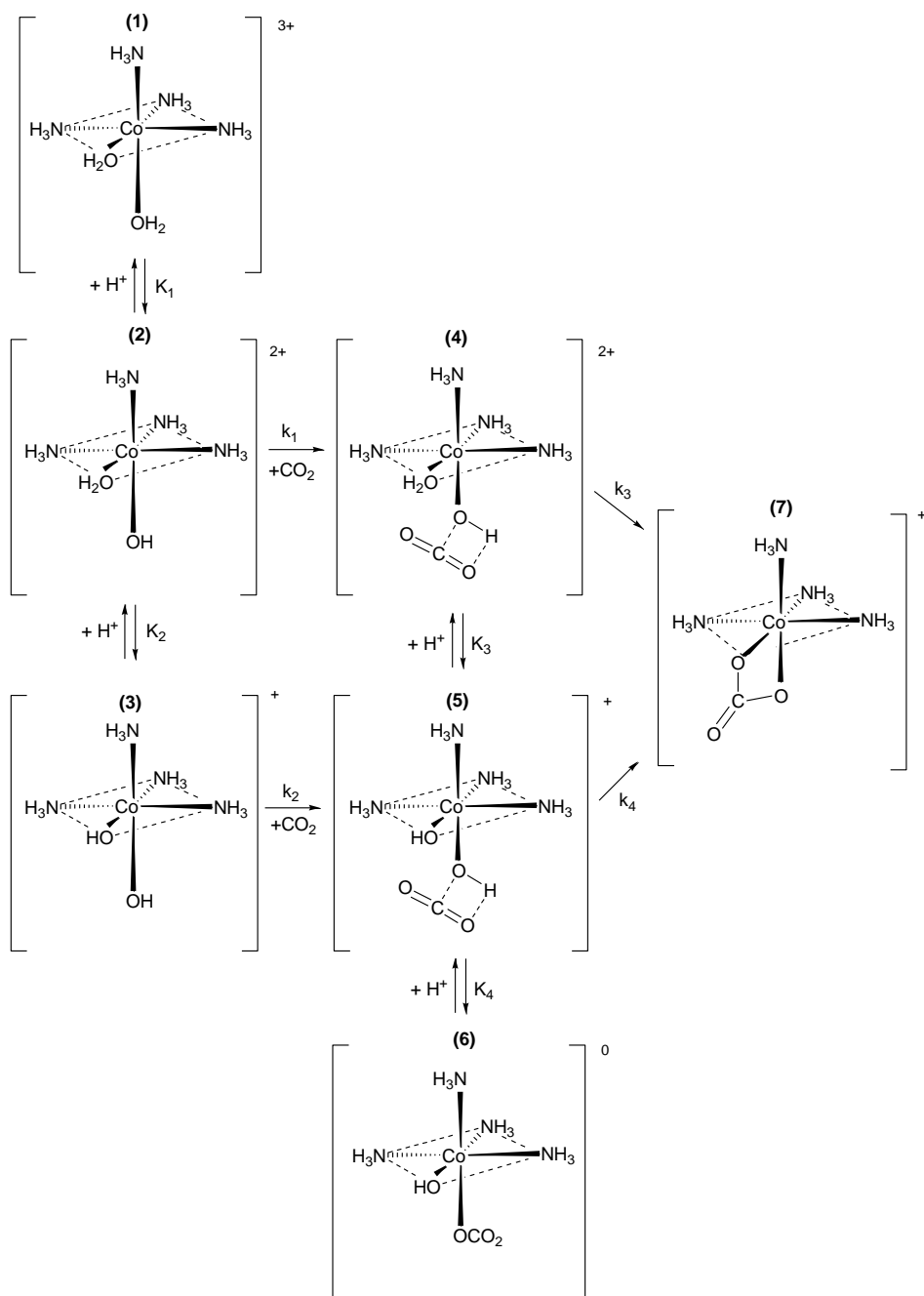
### 3.3.2.3.1 Właściwości fizykochemiczne zsyntezowanych związków kompleksowych

W celu zbadania reakcji wychwytu  $CO_2$  wykorzystałam zsyntezowane połączenia koordynacyjne typu  $cis-[Cr(C_2O_4)(L-L')(OH_2)_2]^+$  gdzie  $L-L'$  oznacza pirydoksaminy, histaminę, 3-amino-2,3-dideoksy- $\lambda$ -D-arabino-heksopiranozyd metylu, 3-amino-2,3-dideoksy- $\beta$ -D-arabino-heksopiranozyd metylu oraz  $cis-[Cr(L-L')_2(OH_2)_2]^{3+}$  gdzie  $L-L'$  oznacza 1,10-fenantrolinę i 2,2'-bipirydył. Reakcja pomiędzy tlenkiem węgla(IV) a zsyntezowanymi wcześniej związkami kompleksowymi doprowadziła do otrzymania węglanowych połączeń koordynacyjnych, które powstały na skutek wprowadzenia do wewnętrznej sfery koordynacyjnej jonu metalu cząsteczki  $CO_2$ . Badania kinetyczne procesu wychwytu tlenku węgla(IV) wykonane techniką zatrzymanego przepływu (stopped-flow) pozwoliły na określenie mechanizmu reakcji substytucji ligandów w poszczególnych związkach koordynacyjnych w roztworze wodnym, dając odpowiedź na pytanie, czy badane układy mogą stanowić modele reakcji enzymatycznych biegnących w układach biologicznych.

W dalszych badaniach przebadalam związek  $[Co(NH_3)_4(H_2O)_2]^{3+}$  pod kątem wychwytu tlenku węgla(IV), a także przeprowadzono badania hydrolizy kwasowej uzyskanego połączenia koordynacyjnego  $[Co(NH_3)_4CO_3]^+$ .

**A) Reakcja wychwytu CO<sub>2</sub> przez jon koordynacyjny [Co(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>3+</sup> w roztworze wodnym<sup>H2</sup>**

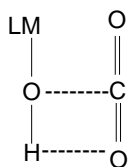
Reakcja pomiędzy tlenkiem węgla(IV), a jonem koordynacyjnym [Co(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>3+</sup> zachodzi w 2 etapach. Mechanizm powyższej reakcji został przedstawiony na Schemacie 1.



**Schemat 1.** Proponowany mechanizm reakcji wychwytu CO<sub>2</sub> przez [Co(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>3+</sup>

## I ETAP reakcji - wychwyt CO<sub>2</sub> przez [Co(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>3+</sup>

Wyjściowy jon koordynacyjny (**1**) istnieje w roztworze w postaci trzech form protolitycznych (**1,2,3**), których stężenia uwarunkowane są wartościami stałych kwasowości K<sub>1</sub> i K<sub>2</sub>. Ze wzrostem pH stężenie związku koordynacyjnego zawierającego dwie grupy hydroksylowe [Co(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(OH)<sub>2</sub>]<sup>+</sup> rośnie. W pierwszym etapie (szybkim) następuje wychwyt CO<sub>2</sub> i powstają pośrednie związki koordynacyjne (**4, 5, 6**), w którym anion węglanowy wiąże się z kationem kobaltu(III) za pomocą jednego atomu tlenu. Reakcja wychwytu CO<sub>2</sub> zachodzi bardzo szybko ponieważ w jej trakcie nie następuje rozerwanie wiązania metal – tlen grupy hydroksylowej, natomiast tworzy się nowe wiązanie pomiędzy atomem węgla z CO<sub>2</sub>, a atomem tlenu z grupy –OH oraz tworzy się wiązanie wodorowe pomiędzy atomem wodoru grupy OH (donor) i atomem tlenu z CO<sub>2</sub> (akceptor) (Rysunek 1).



**Rysunek 1.** Wychwyt CO<sub>2</sub> przez badane połączenie koordynacyjne [Co(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>3+</sup>

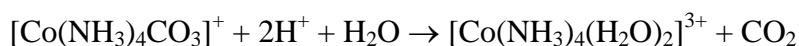
## II ETAP reakcji - zamykanie pierścienia węglanowego

W drugim etapie tej reakcji powstaje produkt końcowy (**7**) z produktów przejściowych (**4, 5**). Ten etap reakcji badano dla długości fali, przy której występuje maksymalna różnica absorbancji pomiędzy substratem a produktem. Produkt przejściowy (**4**) istnieje w roztworze w postaci trzech związków kompleksowych (**4, 5, 6**). Stężenia poszczególnych form zależą od wartości stałych kwasowości K<sub>3</sub> i K<sub>4</sub>, a szybkości tych reakcji wyznaczają stałe szybkości k<sub>3</sub> i k<sub>4</sub>. W określonej temperaturze dla przebadanego kompleksu, wraz ze wzrostem pH, obserwowalna stała szybkości k<sub>2obs</sub> maleje. W drugim etapie tej reakcji powstaje produkt końcowy (**7**). Etap ten jest zakłócany przez reakcję hydrolizy jonu koordynacyjnego (**7**). W związku z tym faktem wartości stałych szybkości k<sub>3</sub>, k<sub>4</sub> oraz wartości stałych kwasowości K<sub>3</sub> oraz K<sub>4</sub> nie można wyznaczyć eksperymentalnie. Reakcja zamknięcia pierścienia (etap 2) jest znacznie wolniejsza w przeciwieństwie do reakcji wychwytu CO<sub>2</sub> (etap 1), zatem o szybkości tej reakcji decyduje etap 2.

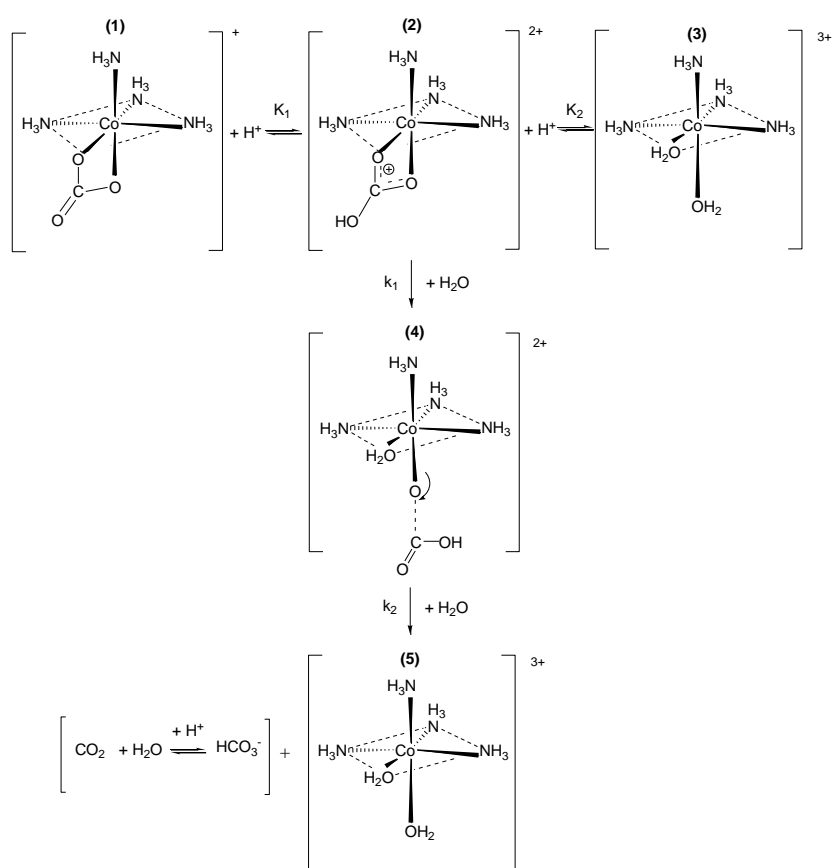


**B) Badania kinetyczne reakcji hydrolizy kwasowej połączenia koordynacyjnego  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{CO}_3]^{\text{H}^+}$**

Reakcja hydrolizy kwasowej kationu  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{CO}_3]^+$  w roztworze wodnym przebiega zgodnie z następującym równaniem stechiometrycznym:



Mechanizm reakcji hydrolizy kwasowej przedstawiłam na Schemacie 2. Reakcja hydrolizy kwasowej  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{CO}_3]^+$  zachodzi w dwóch etapach:



**Schemat 2.** Proponowany mechanizm reakcji hydrolizy kwasowej  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{CO}_3]^+$

**I ETAP reakcji - otwieranie pierścienia węglanowego**

Pierwszy etap reakcji jest etapem wolnym, w którym następuje otwarcie pierścienia węglanowego, jest zależny od stężenia jonów  $[\text{H}^+]$ . Zwiększanie szybkości, czyli wzrost wartości stałej szybkości reakcji otwierania pierścienia chelatowego wraz ze wzrostem stężenia jonów  $\text{H}^+$  jest związane z protonowaniem grupy  $\text{CO}_3^{2-}$  a następnie rozrywaniem

wiązania M – OCO<sub>2</sub>H i podstawianiem w jedno miejsce koordynacyjne cząsteczki wody obecnej w środowisku reakcji.

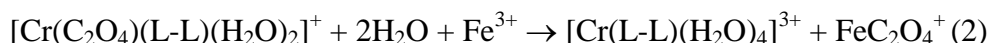
## II ETAP reakcji - reakcja akwatacji

Drugi etap reakcji jest znacznie szybszy od etapu pierwszego. Zachodzi tutaj reakcja akwatacji. Szybkość tego etapu nie zależy od stężenia jonów H<sup>+</sup> w badanej temperaturze, natomiast zależy od temperatury. Niezależność etapu drugiego, reakcji akwatacji, od stężenia jonów H<sup>+</sup> wynika z tego, iż jest to reakcja wymiany liganda wodorowęglanowego na cząsteczkę wody. Tego typu wymiana zachodzi zdecydowanie szybciej w wyższej temperaturze, stąd zależność temperaturowa dla etapu drugiego.

Widmo absorpcyjne produktu końcowego, [Co(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>CO<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, pokrywa się z widmem substratu podczas wychwytu CO<sub>2</sub> przez badane połączenie koordynacyjne.

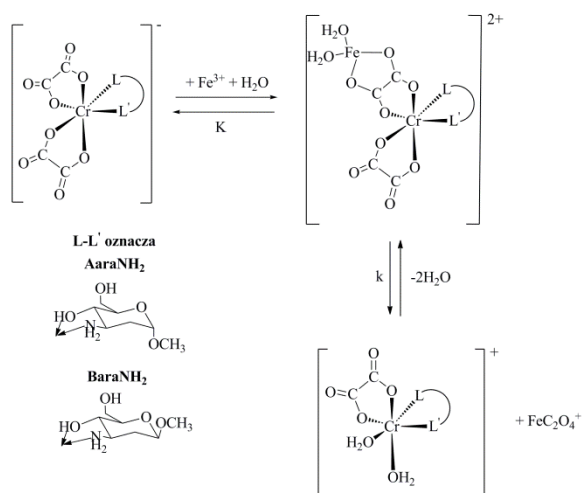
### C) Kinetyczne badania reakcji uwodnienia ligandów szczawianowych indukowanych jonami Fe(III) w połączeniach koordynacyjnych typu [Cr(C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(L-L)]<sup>-</sup> (gdzie L-L oznacza AaraNH<sub>2</sub> and BaraNH<sub>2</sub>)<sup>H8</sup>

Reakcja uwodnienia ligandów szczawianowych indukowanych jonami Fe(III) w połączeniach koordynacyjnych typu [Cr(C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(L-L)]<sup>-</sup> zachodzi według reakcji podanych poniżej:

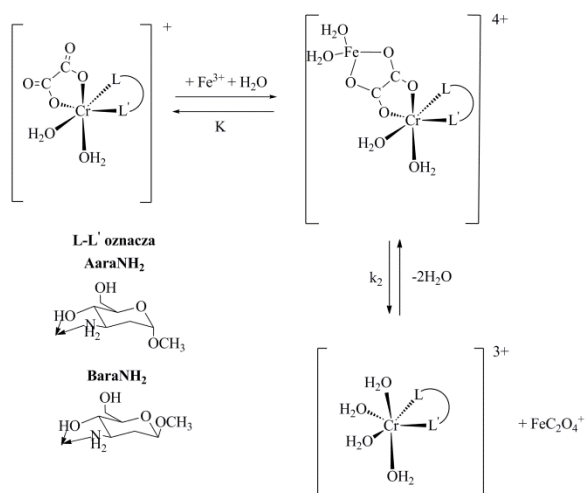


W pierwszej kolejności zbadalam reakcje uwodnienia jednego ligandu szczawianowego w związkach koordynacyjnych: [Cr(C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)<sub>2</sub>AaraNH<sub>2</sub>]<sup>-</sup> i [Cr(C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)<sub>2</sub>BaraNH<sub>2</sub>]<sup>-</sup>. Na podstawie uzyskanych przebiegów kinetycznych stwierdziłam, że badana reakcja przebiega jednoetapowo, z poprzedzającym etapem równowagowym protonowania heterodwudzeniowego związku pośredniego (Schemat 3A).

A



B



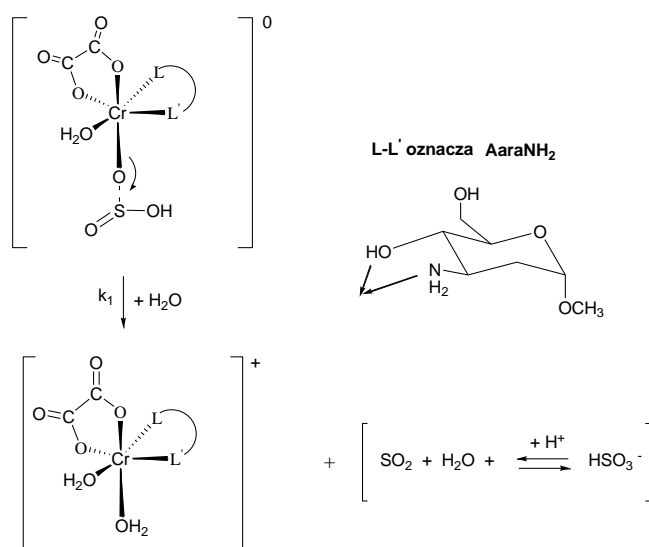
**Schemat 3.** Proponowane mechanizmy reakcji uwodnienia ligandów szczawianowych indukowanych jonami Fe(III) w połączeniach koordynacyjnych: A)  $[\text{Cr}(\text{C}_2\text{O}_4)_2(\text{L-L})]^-$ ; B)  $[\text{Cr}(\text{C}_2\text{O}_4)(\text{L-L})(\text{OH}_2)_2]^+$

Jak wynika ze Schematu 3A w roztworze wodnym podczas indukowania jonami  $\text{Fe}^{3+}$  badanych połączeń koordynacyjnych typu  $[\text{Cr}(\text{C}_2\text{O}_4)_2(\text{L-L})]^-$  tworzy się produkt pośredni – kompleks heterodwurdzeniowy. Produkt pośredni istnieje w równowadze z jonami  $[\text{Cr}(\text{C}_2\text{O}_4)_2(\text{L-L})]^-$ , których stężenia są uwarunkowane wartościami stałych kwasowych. Następnie zachodzi rozkład dwurdzeniowego związku przejściowego z przeniesieniem liganda szczawianowego od chromu(III) do żelaza(III). Reakcja ta powinna zachodzić w dwóch etapach, podczas których powinny ulegać rozerwaniu kolejno 2 wiązania chrom(III) – tlen pochodzący z anionu szczawianowego. Jednakże na podstawie otrzymanych wyników nie można rozróżnić tych etapów, ani nie jest możliwe rozstrzygnięcie problemu, który z tych etapów decyduje o szybkości całego procesu. Z kolei autorzy w jednej z prac [19] o podobnej tematyce dowiedli, że szybciej następuje otwarcie pierścienia chelatowego chrom(III) – anion szczawianowy, niż zerwanie drugiego wiązania chrom – tlen pochodzący od anionu szczawianowego. Produktem końcowym w tej reakcji jest związek koordynacyjny typu  $[\text{Cr}(\text{C}_2\text{O}_4)(\text{L-L})(\text{H}_2\text{O})_2]^+$ .

Ze względu na dużą różnicę szybkości podstawienia pierwszego i drugiego liganda szczawianowego molekułami wody reakcje (1) i (2) badano oddzielnie. Tak samo jak w przypadku reakcji pierwszej, reakcja uwodnienia ligandów szczawianowych indukowanych jonami Fe(III) w połączeniach koordynacyjnych typu  $[\text{Cr}(\text{C}_2\text{O}_4)(\text{L-L})(\text{OH}_2)_2]^+$  przebiega jednoetapowo, z poprzedzającym etapem równowagowym protonowania heterodwurdzeniowego związku pośredniego (Schemat 3B).

**D) Badania kinetyczne reakcji hydrolizy katalizowanej jonami wodorowymi jonu kompleksowego  $cis-[Cr(C_2O_4)(AaraNH_2)(OH_2)(OSO_2)]^{-H3}$**

W konsekwencji wykonanych pomiarów kinetycznych i uzyskanych danych zaproponowałam mechanizm reakcji hydrolizy katalizowanej jonami wodorowymi jonu kompleksowego  $cis-[Cr(C_2O_4)(AaraNH_2)(OH_2)(OSO_2)]^-$ . Przebieg badanej reakcji zaprezentowany został na Schemacie 4. Uwolnienie jonu siarczanowego(IV) w postaci tlenku siarki(IV) poprzedzone jest równowagą protonowania kompleksu wyjściowego  $cis-[Cr(C_2O_4)(AaraNH_2)(OH_2)(OSO_2)]^-$  użytego do badań. Protonowanie jest gwałtowne, a powstający w ten sposób anion wodorosiarczanowy(IV) połączony jest poprzez tlen do jonu chromu(III), który następnie zostaje usunięty z układu. W jego miejsce wprowadzona zostaje, ze środowiska reakcji, cząsteczka wody. W ten sposób liczba koordynacyjna kompleksu chromu(III) nie ulega zmianie (L.K. = 6). Usunięty anion wodorosiarczanowy(IV) ulega reakcji przyłączenia kolejnego protonu, tworząc tlenek siarki(IV) oraz wodę.



**Schemat 4.** Proponowany przebieg reakcji hydrolizy jonu koordynacyjnego  $cis-[Cr(C_2O_4)(AaraNH_2)(OH_2)(OSO_2)]^-$  katalizowanej kwasem  $HClO_4$

**E) Właściwości termiczne  $K[Cr(C_2O_4)_2(OH_2)_2]^{H9}$  i  $[Co(en)_2Cl_2]Cl^{H14}$**

Przeprowadzone zostały badania chemiczne dzięki którym wyznaczono charakterystyki termiczne  $[Co(en)_2Cl_2]Cl^{H14}$  i  $K[Cr(C_2O_4)_2(OH_2)_2]^{H9}$  przy zastosowaniu metod TG-FTIR, TG-DSC-MS. Na podstawie wyników badań termogravimetrycznych wykazane zostało, że związek koordynacyjny  $trans-K[Cr(C_2O_4)_2(OH_2)_2]$  otrzymany został w

postaci trójhydratu, natomiast *cis*-K[Cr(C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>] w postaci niewodnionej. Tym samym, rozkład termiczny *trans*-K[Cr(C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>] następował w trzech etapach, a *cis*-K[Cr(C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>] w dwóch etapach.

Rozkład [Co(en)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]Cl badanego związków jest procesem złożonym i przebiega w trzech etapach. Związek *cis*-[Co(en)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]Cl w temperaturze około 1000°C ulega rozkładowi czemu towarzyszy ubytek masy ok. 4%. Na podstawie wykonanej analizy można wywnioskować, iż badany związek ma właściwości higroskopijne i w jego strukturze występuje cząsteczka wody koordynacyjnej. Powyżej 2200°C dla formy *cis* następuje drugi etap rozkładu. Ubytek masy równy jest ok. 16 %. Z uwagi na obecność efektów egzo- i endotermicznych należy zauważyć, że jest to proces złożony. W temperaturze równej 2900°C rozpoczyna się trzeci etap rozkładu. Zarówno formę *cis* jak i *trans* kompleksu [Co(en)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]Cl w tym etapie charakteryzuje podobny ubytek masy, forma *cis* traci w trzecim etapie 43% masy.

**F) Reakcje izomeryzacji *trans-cis* związków koordynacyjnych K[Cr(C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sup>H9</sup> w roztworze wodnym, [(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>P]<sub>2</sub>PtCl<sub>2</sub><sup>H15</sup> w dimetyloformamidzie oraz [Co(en)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> w metanolu<sup>H14</sup>**

Reakcja izomeryzacji *trans-cis* związku koordynacyjnego K[Cr(C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>] przebiega zgodnie z mechanizmem dysocjacyjnym. Na podstawie wykonanych pomiarów stwierdziłam, że reakcja izomeryzacji *cis-trans* związku koordynacyjnego K[Cr(C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>] jest reakcją pierwszego rzędu, a jej szybkość wzrasta wraz ze wzrostem stężenia i temperatury<sup>H9</sup>.

Reakcja izomeryzacji *trans-cis* [(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>P]<sub>2</sub>PtCl<sub>2</sub> jest katalizowana przez 4 kationy metali Be<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup> i przebiega według mechanizmu dysocjacyjnego. Wraz ze wzrostem temperatury wzrasta szybkość reakcji izomeryzacji. Badana reakcja izomeryzacji jest reakcją pierwszego rzędu. W przypadku obecności jonów magnezu w roztworze stałe szybkości reakcji są około 1,5 raza niższe niż w przypadku zastosowania pozostałych trzech kationów Be<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> oraz Sr<sup>2+</sup><sup>H15</sup>.

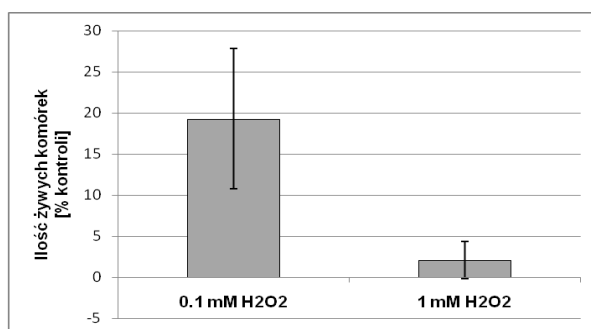
Reakcja izomeryzacji *trans-cis* związku koordynacyjnego [Co(en)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup> w metanolu zachodzi zgodnie z mechanizmem dysocjacyjnym. Stała szybkości reakcji k<sub>obs</sub> rośnie wraz ze wzrostem temperatury. Zjawisko to zgodne jest z teorią kompleksu aktywnego, gdyż w wyższej temperaturze większa ilość cząstek osiąga energię potrzebną do zajścia reakcji. Badana reakcja jest reakcją pierwszego rzędu<sup>H14</sup>.

### 3.3.2.4 Badania biologiczne

#### 3.3.2.4.1 Metoda oznaczania tlenku węgla(IV) i nadtlenu wodoru w układach biologicznych

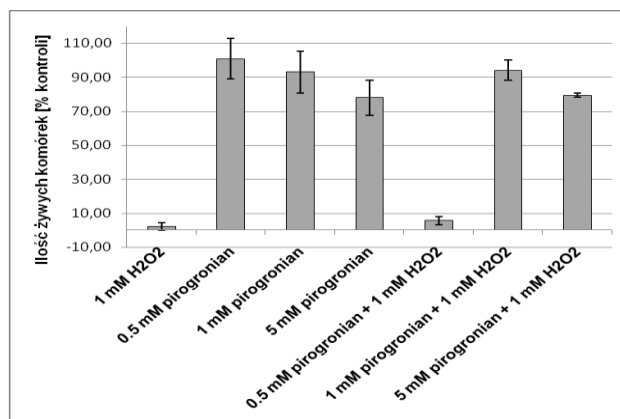
Wykorzystanie zsyntezowanych połączeń koordynacyjnych umożliwiło wykonanie badań dotyczących reakcji wychwytu CO<sub>2</sub> przez otrzymane połączenia koordynacyjne, a następnie pozwoliło na stworzenie modelowego układu typu Cr(III) – ligand organiczny. W tego konsekwencji przebadalam zsyntezowane uprzednio związki koordynacyjne pod kątem oznaczania tlenku węgla(IV) i nadtlenu wodoru w materiale biologicznym i na ich podstawie stwierdziłam, że tylko jeden z nich nadaje się do badań biologicznych jako biosensor (*cis*-[Cr(C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)(pm)(OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>). Dzięki zastosowaniu tego związku koordynacyjnego chromu(III) z pirydoksamina zaobserwowałam znaczące spowolnienie bardzo szybkich reakcji zachodzących w układach biologicznych. W konsekwencji tej obserwacji przeprowadziłam standaryzację otrzymanego biosensora. W kolejnym etapie badań opracowałam metodę oznaczania nadtlenu wodoru poprzez pomiar szybkości reakcji wychwytu uwalnianego tlenku węgla(IV) i zarazem określiłam stężenia nadtlenu wodoru w układach biologicznych.

Stosując metodę oznaczania CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w układach biologicznych zbadalam wpływ nadtlenu wodoru na komórki hipokampa w obecności i nieobecności  $\alpha$ -ketokwasów<sup>H5</sup>. Ocena cytotoksyczności H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> względem komórek linii HT22 wykazała, że obniża on przeżywalność komórek (Rysunek 2). Po 24 godzinnej inkubacji komórek HT22 z 0.1 mM i 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilość żywych komórek wyniosła odpowiednio 19.3% i 2.1% (Rysunek 2). Na podstawie uzyskanych wyników stwierdziłam, że w dalszych badaniach biologicznych będę stosowała H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w stężeniu 1 mM.



**Rysunek 2. Wpływ nadtlenu wodoru na komórki linii HT22.** Komórki HT22 inkubowano z H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> przez 24 godziny. Przeżywalność komórek określono w oparciu o test MTT. Przeżywalność komórek w próbkach traktowanych H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> przedstawiono jako % kontroli (kontrola - komórki nietraktowane H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Na wykresie przedstawiono wartości średnie z uwzględnieniem odchyłeń standardowych z trzech niezależnych doświadczeń.

Po 24 godzinach inkubacji z 0.5 mM pirogromianem sodu przeżywalność komórek HT22 wynosiła 100.9% (Rysunek 3). Inkubacja komórek z 1 mM i 5mM pirogromianem sodu prowadziła do obniżenia przeżywalności komórek (Rysunek 3). Ilość żywych komórek wyniosła wówczas odpowiednio 93.2% i 78%. Prawdopodobnie może to być związane np. z efektem zakwaszenia środowiska wewnątrzkomórkowego/zewnątrzkomórkowego wywołwanym przez wyższe stężenia pirogromianu. W porównaniu do próbek traktowanych tylko 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30 minutowa preinkubacja komórek z pirogromianem sodu poprzedzająca 24-godziną inkubację z 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> prowadziła do podwyższenia przeżywalności komórek (Rysunek 3). Efekt ten był najbardziej wyraźny w przypadku 1 mM pirogromianu sodu. Ilość komórek żywych wynosiła wówczas 94.1%. W przypadku większego - 5 mM stężenia pirogromianu sodu obserwowano nieco słabszy efekt ochronny niż w przypadku 1 mM pirogromianu sodu - ilość komórek żywych wynosiła wówczas 79.5%. Prawdopodobnie może to być związane np. z efektem zakwaszenia środowiska wewnątrzkomórkowego /zewnątrzkomórkowego.



**Rysunek 3. Wpływ nadtlenu wodoru na komórki linii HT22 w obecności/nieobecności pirogromianu.** Komórki HT22 inkubowano z 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lub z 0.5 mM, 1 mM, 5 mM pirogromianem sodu przez 24 godziny. Dodatkowo, komórki inkubowano przez 30 minut z odpowiednio 0.5 mM, 1 mM, 5 mM pirogromianem sodu i następnie inkubowano z 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> przez kolejne 24 godziny. Przeżywalność komórek określono w oparciu o test MTT. Przeżywalność komórek w próbkach traktowanych związkami (pirogromian, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) przedstawiono jako % kontroli (kontrola - komórki nietraktowane związkami). Na wykresie przedstawiono wartości średnie z uwzględnieniem odchyłeń standardowych z trzech niezależnych doświadczeń.

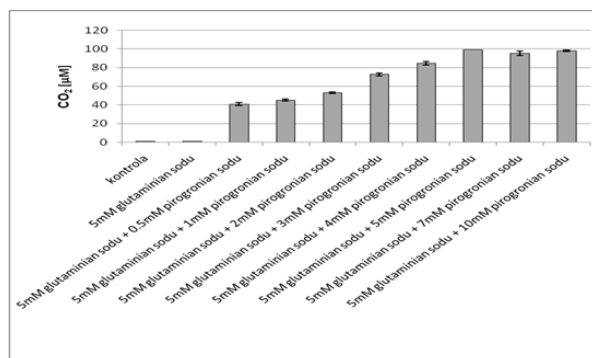
Kolejne badania biologiczne zostały przeprowadzone w oparciu o wykorzystanie  $\alpha$ -ketokwasów i związku koordynacyjnego *cis*-[Cr(C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)(pm)(OH)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, z zastosowaniem techniki zatrzymanego przepływu (stopped-flow)<sup>H13</sup>. Wykorzystałam dwa  $\alpha$ -ketokwasy: pirogromian i  $\alpha$ -ketomaślan. W badanym modelu eksperymentalnym ilość mierzonego CO<sub>2</sub> koreluje z ilością powstającego H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Poziom CO<sub>2</sub> określono w lizatach komórkowych i supernatantach. Każdy z wymienionych prezentuje różny skład chemiczny i może być traktowany jako odrębny model badawczy.

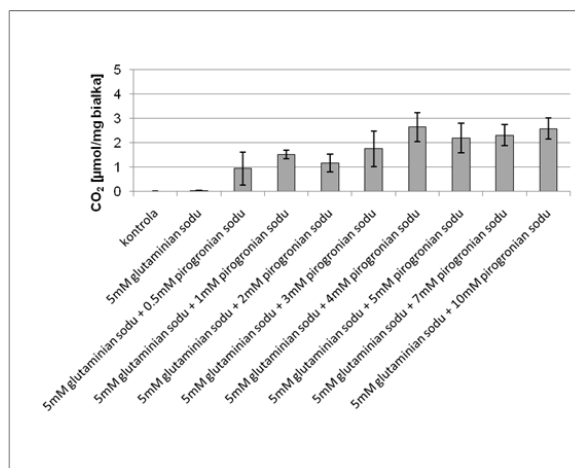
#### a) Poziom CO<sub>2</sub> w lizatach komórkowych

Na Rysunku 4A i 4B przedstawiłam poziom CO<sub>2</sub> w lizatach komórkowych wyrażony odpowiednio w μM (4A) i μmol/mg białka (4B). W przypadku stężeń pirogronianu mieszczących się w zakresie 0.5 - 4 mM, poziom CO<sub>2</sub> stopniowo wzrastał (Rysunek 4A, 4B), natomiast w przypadku stężeń pirogronianu 5 – 10 mM, poziom CO<sub>2</sub> w próbkach badanych utrzymywał się mniej więcej na stałym poziomie (Rysunek 4A, 4B) . W wykorzystanym modelu badawczym głównym źródłem CO<sub>2</sub> w lizatach komórkowych jest reakcja pirogronianu z H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> powstającym w komórkach HT22 traktowanych 5 mM glutaminianem sodu.

**A**



**B**



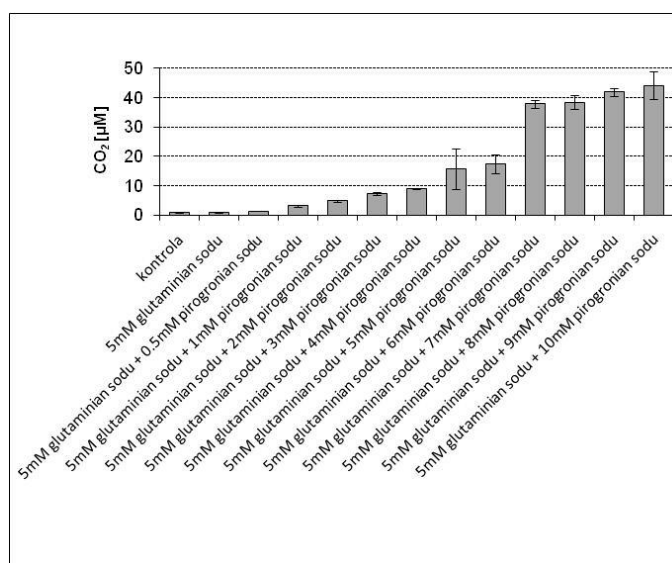
**Rysunek 4. Poziom CO<sub>2</sub> w lizatach komórkowych wyrażony w μM (A) oraz μmol/mg białka (B).** Komórki HT22 inkubowano przez 24 godziny z 5 mM glutaminianem sodu. Kontrola – komórki nietraktowane 5 mM glutaminianem sodu. Po zakończeniu inkubacji komórki zwirowano i odebrano supernatanty (pożywkę z nad osadu komórek). Przeprowadzono lizę komórek. Przed pomiarem CO<sub>2</sub> do lizatów komórkowych dodano pirogronian sodu, uzyskując jego stężenie końcowe od 0.5 do 10 mM. Do próbek kontrolnych nie dodano pirogronianu sodu. Poziom CO<sub>2</sub> określono wykorzystując kation koordynacyjny *cis*-[Cr(C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)(pm)(OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, przy użyciu techniki zatrzymanego przepływu (stopped-flow). Na wykresie przedstawiono wartości średnie z uwzględnieniem odchyłeń standardowych z trzech niezależnych doświadczeń.



## b) Poziom CO<sub>2</sub> w supernatantach

Na Rysunku 5 przedstawiłam poziom CO<sub>2</sub> w supernatantach. Po dodaniu pirogronianu w zakresie stężenia 0.5 – 6 mM do supernatantów oddzielonych od komórek traktowanych 5 mM glutaminianem sodu, poziom CO<sub>2</sub> stopniowo wzrastał (Rysunek 5). Przy stężeniach pirogronianu 7 - 10 mM, stężenie CO<sub>2</sub> w próbkach badanych utrzymywał się na mniej więcej na stałym poziomie (Rysunek 5). Głównym źródłem CO<sub>2</sub> w supernatantach jest reakcja pirogronianu z H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uwolnionym przez komórki HT22 traktowane 5 mM glutaminianem sodu (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> posiada zdolność do przenikania przez błony biologiczne). Dodatkowym źródłem CO<sub>2</sub> może być również utlenienie składników pożywki hodowlanej.

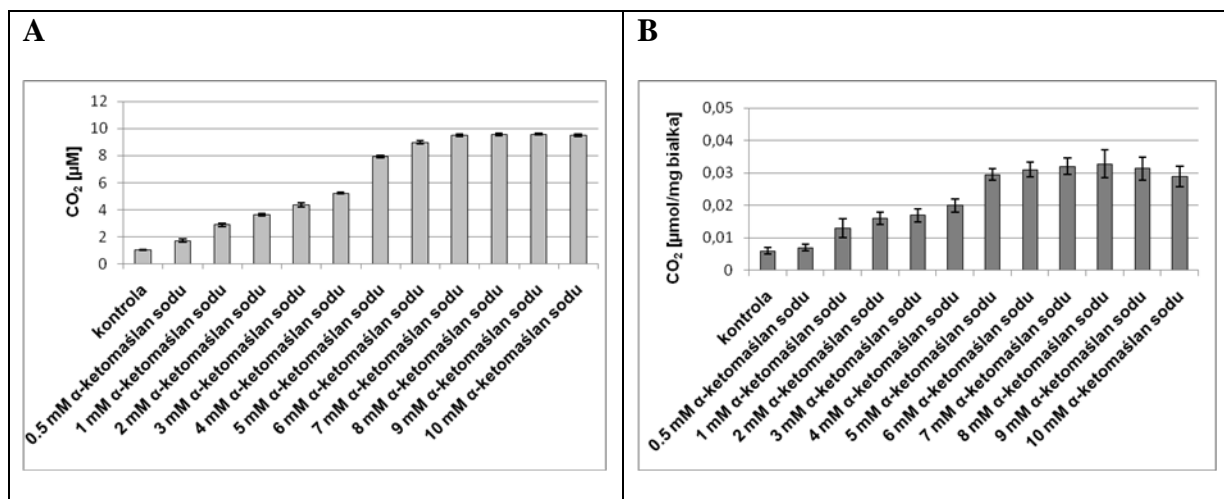
Na podstawie powyższych danych stwierdziłam, że stężenie pirogronianu mieszczące się w zakresie 5 – 10 mM może być stosowane w określaniu poziomu CO<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) w lizatach komórek traktowanych 5 mM glutaminianem sodu. Stężenie pirogronianu mieszczące się w zakresie 7 – 10 mM może być stosowane w określaniu poziomu CO<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) w supernatantach oddzielonych od komórek traktowanych 5 mM glutaminianem sodu.



**Rysunek 5. Poziom CO<sub>2</sub> w supernatantach.** Komórki HT22 inkubowano przez 24 godziny z 5 mM glutaminianem sodu. Kontrola – komórki nietraktowane 5 mM glutaminianem sodu. Po zakończeniu inkubacji komórki zwirowano i odebrano supernatanty (pożywkę znad osadu komórek). Przed pomiarem stężenia CO<sub>2</sub> dodano pirogronian sodu, uzyskując jego stężenie końcowe od 0.5 do 10 mM. Do próbek kontrolnych nie dodano pirogronianu sodu. Poziom CO<sub>2</sub> określono wykorzystując kation koordynacyjny *cis*-[Cr(C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)(pm)(OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, przy użyciu techniki zatrzymanego przepływu (stopped-flow). Na wykresie przedstawiono wartości średnie z uwzględnieniem odchyłek standardowych z trzech niezależnych doświadczeń.

## c) Detekcja CO<sub>2</sub> i obliczenie ilości H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w obecności i nieobecności α-ketomaślanu sodu

Poziom CO<sub>2</sub> określiłam również w lizatach komórek HT22 (Rysunek 6A, 6B). Przed pomiarem CO<sub>2</sub> dodano α-ketomaślan sodu w odpowiednim stężeniu.



**Rysunek 6. Detekcja poziomu CO<sub>2</sub> wyrażonego w  $\mu$ M (A) oraz  $\mu$ mol/mg białka (B)** (Kontrola – lizaty komórkowe do których przed pomiarem CO<sub>2</sub> nie dodano  $\alpha$ -ketomaślanu sodu. Poziom CO<sub>2</sub> określono wykorzystując kation koordynacyjny *cis*-[Cr(C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)(pm)(OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, przy użyciu techniki zatrzymanego przepływu (stopped-flow). Na wykresie przedstawiono wartości średnie z uwzględnieniem odchyłeń standardowych z trzech niezależnych doświadczeń.

Na podstawie powyższych danych stwierdziłam, że poziom CO<sub>2</sub> w próbkach kontrolnych, mierzony w nieobecności  $\alpha$ -ketomaślanu, wyniósł 1.04  $\mu$ M ( $\pm$ 0,05) (Rysunek 6A), a w przeliczeniu na 1 mg białka 0.06  $\mu$ mol/mg białka ( $\pm$ 0,01) (Rysunek 6 B). W przypadku stężeń  $\alpha$ -ketomaślanu sodu mieszczących się w zakresie 0.5 - 4 mM, poziom CO<sub>2</sub> w próbkach badanych stopniowo wzrastał, natomiast w przypadku stężeń  $\alpha$ -ketomaślanu sodu 5 – 10 mM, poziom CO<sub>2</sub> utrzymywał się na mniej więcej na stałym poziomie (Rysunek 6A, 6B). Sugeruje to, że stężenie  $\alpha$ -ketomaślanu mieszczące się w zakresie 5 – 10 mM może być stosowane w określaniu poziomu CO<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) w lizatach komórkowych w badanym modelu doświadczalnym<sup>H12</sup>.

### 3.3.2.4.2 Metoda oznaczania tlenu azotu(IV) w układach biologicznych.

Drugą metodą którą opracowałam, była to metoda oznaczania tlenu azotu(IV) w materiale biologicznym. Badania rozpoczęły się od poszukiwania biosensora. W pierwszej kolejności zsyntezowałam modelowe połączenia koordynacyjne typu *cis*-[Cr(C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)(L-L)(OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, które otrzymane zostały z dostępnych handlowo odczynników. W pozycję liganda wprowadzono histaminę, pirydoksaminę, 1,10-fenantrolinę i 2,2-bipirydył. Następnie zaproponowałam mechanizmy wychwyty NO<sub>2</sub> przez zsyntezowane związki koordynacyjne, co pozwoliło na stworzenie modelowego układu typu Cr(III) – ligand

organiczny<sup>H1</sup>. Jednak przeprowadzone przy ich udziale wstępnie badania biologiczne na obecność  $\cdot\text{NO}_2$  w cytozolu izolowanego z trzustek szczura zatrutego  $\cdot\text{NO}_2$  nie dały oczekiwanych rezultatów. W konsekwencji tego rozpoczęłam poszukiwania innego typu liganda organicznego. W następnym etapie przeprowadzono syntezę izomerycznych pochodnych 3-amino-2,3-dideoksycukrów jako ligandów. Zsyntezowanie połączeń koordynacyjnych Cr(III) z serią izomerycznych pochodnych 3-amino-2,3-dideoksyheksopiranozydów i kolejno wykorzystanie ich do detekcji  $\cdot\text{NO}_2$  uwalnianego z badanego materiału biologicznego dało zaskakująco pozytywne wyniki. Dzięki zastosowaniu połączeń koordynacyjnych inertnego Cr(III) z pochodnymi 3-amino-2,3-dideksycukrów, zaobserwowałam znaczące spowolnienie bardzo szybkich reakcji zachodzących w układach biologicznych. W konsekwencji tego możliwym było śledzenie kinetyki wychwytu uwalnianego  $\cdot\text{NO}_2$ .

W następnym etapie zastosowałam opracowaną metodę oznaczania tlenku azotu(IV) w materiale biologicznym. Do tego celu wykorzystywałam zsyntezowany uprzednio związek koordynacyjny  $\text{cis-}[\text{Cr}(\text{C}_2\text{O}_4)(\text{AaraNH}_2)(\text{OH}_2)_2]^+$ . Do badań biologicznych zastosowano model zwierzęcy zapalenia trzustki, gdzie stres nitrozacyjny wywołano stosując dawki L-argininy 3g/kg lub 1,5 g / kg masy ciała. Obserwowano również zmiany morfologii komórek przebiegu ostrego zapalenia trzustki jak również poziom glutationu w komórkach. Dzięki zastosowaniu metody oznaczania rodnika tlenku azotu(IV) możliwe było oznaczenie nanomolowych ilości tego rodnika w materiale komórkowym. Wyniki moich badań sugerują, że  $\text{NO}_2$  bezpośrednio, a nie na skutek przebiegu ostrego zapalenia trzustki, powoduje obniżenie poziomu glutationu. Dodatkowo wykazałam również rolę ochronną akceptora rodników 4-OH-TEMPO w stosunku do toksycznych wolnych rodników w eksperymencie trzustkowym<sup>H7</sup>.

### 3.3.3. Podsumowanie

Zsyntezowałam związki koordynacyjne, zawierające w centrum koordynacji jon  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{3+}$  oraz  $\text{Pt}^{2+}$  z biologicznie czynnymi ligandami organicznymi oraz z innymi (pomocniczymi) ligandami organicznymi i nieorganicznymi. Wszystkie zsyntezowane związki kompleksowe przebadalam pod kątem właściwości fizykochemicznych.

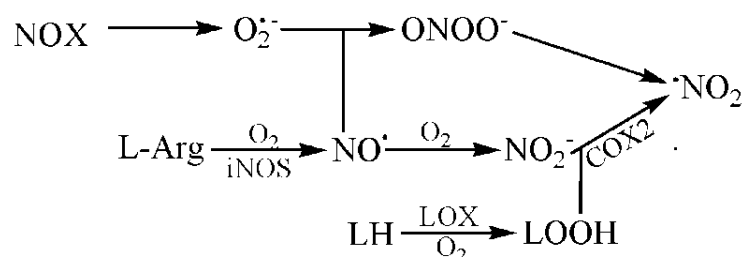
Następnie zaproponowałam dwie metody: oznaczania stężenia nadtlenu wodoru oraz tlenku azotu(IV), które wykorzystywałam w badaniach biologicznych. Oznaczanie nadtlenu

wodoru przeprowadziłam przy wykorzystaniu techniki zatrzymanego przepływu (stopped-flow). Zaskakująco dobre rezultaty uzyskałam, wykorzystując związek koordynacyjny typu (*cis*-[Cr(C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)(pm)(OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>) do oznaczania nadtlenu wodoru w materiale biologicznym. Do przeprowadzenia pomiarów dotyczących wyznaczenia stężenia nadtlenu wodoru, użyłam spektrofotometru Applied Photophysics, SX-17MV, a obserwowalne stałe szybkości policzyłam za pomocą programu „Glint” opartego na analizie globalnej. Na podstawie otrzymanych danych kinetycznych określiłam w pierwszej kolejności mechanizm reakcji wychwytu CO<sub>2</sub>, generowanego na drodze prostej reakcji chemicznej węglanu sodu z kwasem solnym. Uzyskałam w ten sposób model kinetyczny, który odtworzyłam w kolejnych badaniach, w których do generowania CO<sub>2</sub> wykorzystałam pirogronian będący bezpośrednim źródłem CO<sub>2</sub>. Ponieważ stosunek stechiometryczny tlenu węgla (IV) do nadtlenu wodoru jest jak 1:1 (pirogronian + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> → octan + CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O), obliczona ilość CO<sub>2</sub> jest równa ilości nadtlenu wodoru. Zastosowanie tego odczynnika pozwoliło zbliżyć warunki eksperymentu do warunków oznaczania nadtlenu wodoru w układach biologicznych. W celu ustalenia stężenia ditlenku węgla powstającego w następstwie metabolicznej konwersji CO<sub>2</sub> porównałam ilość ditlenku węgla uwalnianą z metabolicznie aktywnego (pirogronian) i inertnego (α-ketomaślan) α-ketokwasu. W badaniach biologicznych określiłam wpływ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (dodawanego egzogennie lub generowanego endogennie w następstwie ekspozycji komórek na glutaminian) na przeżywalność komórek linii HT22 w obecności i nieobecności pirogronianu, α-ketomaślanu i glutaminianu. Jako metodę oceny cytotoxycywności wyżej wymienionych związków zastosowano test MTT, opierający się na przebiegającej w mitochondriach żywych komórek redukcji soli tetrazolowej MTT do formazanu. W celu określenia rodzaju śmierci komórkowej, jakiej ulegają komórki linii HT22 pod wpływem nadtlenu wodoru i glutaminianu, przeprowadzono analizę cytometryczną komórek barwionych jodkiem propidyny i aneksyną V-FITC (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit), umożliwiającą ocenę integralności błony oraz wykrycie utraty asymetrii rozmieszczenia fosfolipidów błonowych (ekspozycja fosfatydyloseryny w zewnętrznej warstwie błony). Ponadto, przeprowadzono analizę cyklu komórkowego komórek tej linii przy użyciu metody barwienia jodkiem propidyny, z wykorzystaniem cytometrii przepływowej.

Zsyntezowałam również potencjalne biosensory do oznaczania stężenia rodnika tlenu azotu(IV) w materiale biologicznym – związki koordynacyjne chromu(III) zawierające anomery 3-amino-2,3-dideoksy-D-arabino-heksopiranozydów metylu (Aara i Bara). W aspekcie biologicznym wykazałam, że biosensory zawierające w swoim składzie 3-amino-2,3-dideoksy-α-D-arabinoheksapiranozyd metylu (Aara) wychwytyją tlenek azotu(IV)

powstający w reakcji anionorodnika ponadtlenkowego i tlenku azotu (II). Biosensory te nie reagują z tlenkiem azotu (II) i anionem nadtlenuazotanowym(III), co potwierdza selektywność detekcji tlenku azotu(IV) jako jedynego rodnika w układzie eksperymentalnym.

Zsyntezowane uprzednio przeze mnie biosensory molekularne oraz opracowany model chemiczny dotyczący oznaczania stężenia rodnika ditlenku azotu pozwoliły na zaproponowanie modelu biologicznego oznaczania poziomu  $\text{NO}_2$  w makrofagach (RAW 264.7) Oznaczając ilościowo produkty nitrowania w linii RAW 264.7) zasugerowałam wyłączny udział rodników  $\text{NO}_2$  w reakcji z wykluczeniem udziału anionu nadtlenuazotanowego (Schemat 5). Na schemacie przedstawiłam współdziałanie indukowanej syntazy NO (iNOS) oraz lipoksygenazy (LOX) w dostarczaniu substratów  $\text{NO}_2^-$  i wodorotlenków kwasów tłuszczowych dla cyklooksyzgenazy konwertującej  $\text{NO}_2^-$  do tlenku azotu(IV) ( $\text{LOOH}$ ).



**Schemat 5.** Szlaki enzymatyczne prowadzące do powstawania rodnika  $\text{NO}_2$  w komórkach RAW 264.7

### 3.3.4. Charakter aplikacyjny badań

Przeprowadzone badania chemiczne i biologiczne pokazały nowe kierunki w projektowaniu związków koordynacyjnych o pożądanych właściwościach fizykochemicznych, które w dalszych etapach badań będą mogły znaleźć zastosowanie w nowoczesnej medycynie diagnostycznej jako biosensory molekularne reaktywnych form tlenu i azotu.

Opracowanie nowej ilościowej metody równoczesnego oznaczania  $\text{CO}_2$  i nadtlenu wodoru powstającego w układach biologicznych pozwoli na zrozumienie roli sygnalizacyjnej tej reaktywnej formy tlenu w uzyskiwaniu odporności struktur podwzgórza na sygnalizacyjną anorektyczną regulację leptyny prowadzącą do cukrzycy typu II lub schorzeń neurodegeneracyjnych. Ponadto dzięki takiej metodzie możliwe będzie opracowanie analizy molekularnej ścieżek sygnalizacyjnych stresu oksydacyjnego w komórkach hipokampa.

Z kolei opracowanie czułych biosensorów molekularnych (o czułości wystarczającej do oznaczania w układach biologicznych stężeń rzędu  $10^{-10}$  M) selektywnie „wyłapujące” rodnik tlenku azotu(IV) i ich zastosowanie do ewaluacji poziomu tej reaktywnej formy azotu generowanej w stanach zapalnych pozwoli na ocenę dynamiki stresu oksydacyjnego i nitrozacyjnego inicjujących szlaki sygnalizacyjne prowadzące do nekrozy i apoptozy komórek pęcherzykowych trzustki.

#### LITERATURA

- [1] P. Henschrey, A. M. Sargeson, *Aust. J. Chem.*, **39**, 1177, 1986.
- [2] M. I. Clark, H. Taube, *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 5413, 1974.
- [3] K. D. Danenberg, W. W. Cleland, *Biochem.*, **14**, 28, 1975.
- [4] M. Cieślak-Golonka, *Wiadomości Chem.*, **45**, 403, 1991.
- [5] J. Barrett, P. O'Brien, J. Pedrosa de Jesus, *Polyh.*, **4**, 1, 1985.
- [6] D. H. Brown, W. E. Smith, M. S. El-Shahawi, M. F. K. Wazir, *Inorg. Chem. Acta*, **124**, L-25, 1986.
- [7] W. Mertz, K. Schwarz, *Am. J. Physiol.*, **196**, 614, 1959.
- [8] Takacs, T., Czako, L., Morschl, E., Laszlo, F., Tiszlavicz, L., Rakonczay, Z.-Jr.; Lonovics, J., *Pancr.*, **25(3)**, 277, 2002.
- [9] I. S. Varga, B. Matkovics, L. Czako, D. Q. Hai, M. Kotorman, T. Takacs, M. Sasvari, *Pancr.*, **14(4)**, 355, 1997.
- [10] L. Czako, T. Takacs, I. S. Varga, L. Tiszlavicz, D. Q. Hai, P. Hegyi, B. Matkovics, J. Lonovics, *Dig Dis Sci.* **43(8)**, 1770, 1998.
- [11] J. S. Beckman, W. H. Koppenol, *Am J Physiol.* **271**, C1424, 1996.
- [12] R. Wever, E. Stroes, T. J. Rabelink, *Atheroscl.*, **137 Suppl**, S51, 1998.
- [13] R. J. Gryglewski, R. M. Palmer, S. Moncada, *Nature.*, **320**, 454, 1986.
- [14] R. Radi, *Chem. Res. Toxicol.* **9**, 822, 1996.
- [15] K. J. Reska, Z. Matuszak, C. F. Chignell, J. Dillon, *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 669, 1999.
- [16] U. Burner, P. G. Furtmüller, A. J. Kettle, W. H. Koppenol, C. Obinger, *J. Biol. Chem.* **275**, 20597, 2000.
- [17] A. Nedospasov, R. Rafikov, N. Beda, E. Nudler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 13543, 2000.
- [18] J. P. Eiserich, M. Hristova, C. E. Cross, A. D. Jones, B. A. Freeman, B. Halliwell, A. van der Vliet, *Nature* **22;391(6665)**, 393, 1998.
- [19] T. W. Kallen, *Inorg. Chem.*, **14**, 2687, 1975.

#### 4. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych po osiągnięciu stopnia doktora.

Pozostałe moje osiągnięcia naukowe dotyczyły przede wszystkim problematyki poszukiwania potencjalnych biosensorów molekularnych reaktywnych form azotu i tlenu (RNOS) z wykorzystaniem różnych technik, wśród których wymienić należy głównie spektrofotometrię UV-Vis, spektroskopię fluorescencyjną oraz wysokosprawną chromatografię ciekową sprzężoną ze spektrometrią mas. Wstępne wyniki przeprowadzonych badań dowodzą, że 1,3-difenyloizobenzofuran może być z powodzeniem wykorzystywany w badaniach biologicznych w celu określenia w materiale biologicznym natężenia stresu komórkowego, spowodowanego obecnością reaktywnych form tlenu i azotu<sup>12</sup>.

Innym aspektem prowadzonych badań jest opracowanie pośredniej metody ilościowego oznaczania całkowitej zawartości reaktywnych form azotu i tlenu w badanej próbce. W tym celu skupiono się na określeniu rodzaju oddziaływań pomiędzy wybranymi związkami wykazującymi fluorescencję a 4-hydrokso-TEMPO, najszerzej przebadaną pod kątem oddziaływań z reaktywnymi formami azotu i tlenu pochodną rodnika nitroksylowego, wykorzystywaną jako „zmiatacz” wolnych rodników powstałych w organizmie w wyniku różnych procesów fizjologicznych. Pod kątem oddziaływań z 4-hydrokso-TEMPO udało się przebadać kompleksowo 16 fluoroforów:

- 4 wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne<sup>11</sup>
- 8 pochodnych kumaryny<sup>17</sup>
- 4 antybiotyki fluorochinolonowe<sup>18</sup>

Przeprowadzone - z wykorzystaniem spektroskopii absorpcyjnej i fluorescencyjnej, zarówno stacjonarnej, jak i czasowo-rozdzielczej - badania miały na celu znalezienie związku wykazującego fluorescencję, który oddziaływałby z pochodną rodnika nitroksylowego w sposób selektywny lub specyficzny. W przypadku wszystkich przebadanych w ten sposób związków zaobserwowano spadek intensywności ich fluorescencji pod wpływem 4-hydrokso-TEMPO. Dalsze badania wykazały, że oddziaływania tych fluoroforów ze „zmiataczem” mają charakter czysto fizyczny, a zanik fluorescencji jest wynikiem jej wygaszania zgodnie z mechanizmem dynamicznym.

Jedno z pozostałych osiągnięć naukowych polegało na otrzymaniu formy krystalicznej nowego związku kompleksowego żelaza(III), tj. tetrachlorożelazianu(III) 2-metylopirydyniowego,  $[2\text{-Me(Py)H}][\text{FeCl}_4]$  gdzie  $2\text{-Me(Py)H}^+$  oznacza kation 2-metylopirydyniowy. Na podstawie pomiarów rentgenograficznych wyznaczona została również struktura tego związku<sup>3</sup>. Ponadto, metodami analizy termicznej (TG, DTG oraz DSC) określone zostały charakterystyki termiczne serii soli tetrachlorożelazianowych(III) z kationami 2-, 3- oraz 4-metylopirydyniowym. Badania wykazały, że badane kompleksy wykazują wysoką stabilność termiczną w fazie ciekłej. Ich temperatury topnienia są bliskie 100°C, a rozkład kompleksów następuje dopiero w temperaturze o 100 stopni wyższej. Z tego powodu analizowane związki stanowią potencjalnie atrakcyjne, stabilne termicznie, paramagnetyczne ciecze jonowe.

Kolejne badania, w których brałam czynny udział dotyczą metod miareczkowania kalorymetrycznego oraz potencjometrycznego, które zostały wykorzystane do zbadania oddziaływań jonów kobaltu(II), niklu(II) oraz cynku ze składnikami roztworów buforowych, powszechnie wykorzystywanymi do badań biologicznych, tj. z kwasem 2-(N-morfolino)-

etanosulfonowym (bufor MES), z kwasem 1,4-piperazynodietanosulfonowym (bufor PIPES) oraz z kwasem kakodylowym (bufor Caco)<sup>10,19</sup>. Z uwagi na słabe oddziaływania badanych jonów ze składnikami roztworów buforowych, zastosowana została metoda miareczkowania konkurencyjnego, w której słaby ligand (składnik buforu) obecny w sferze koordynacyjnej jonu metalu był podstawiany (wymieniany) w reakcji kompleksowania przez silny ligand tj. anion kwasu nitrylotriooctowego. Zmiana entalpii badanej reakcji była następnie obliczana na podstawie równania opartego na prawie Hess'a. Zaproponowane podejście umożliwiło wyznaczenia funkcji termodynamicznych badanych reakcji niezależnych od pH środowiska reakcji. Otrzymane dane pozwoli wyciągnąć wnioski odnośnie zależności między strukturą powstających połączeń a wyznaczonymi wartościami funkcji termodynamicznych.

Uczestniczyłam również w badaniach dotyczących oddziaływań jonów miedzi(II) z glicyloglicyną<sup>9</sup>. W tym celu wykorzystano wzajemnie się uzupełniające techniki, tj. kalorymetryczną oraz potencjometryczną. Zastosowanie w pomiarach kalorymetrycznych trzech roztworów buforowych o różnej wartości entalpii jonizacji umożliwiło obliczenie liczby moli protonów wymienianych między glicyloglicyną a składnikiem buforu na skutek tworzenia się połączenia kompleksowego. Wyniki badań dostarczyły istotnych danych odnośnie sposobu oddziaływania jonów miedzi(II) z badanym dipeptydem.

Z moim udziałem zbadana została trwałość termodynamiczna oraz kinetyczna trójskładnikowych związków koordynacyjnych kobaltu(II) oraz niklu(II) z ligandem diglikolanowym oraz z ligandami pomocniczymi, tj. fenantrolina oraz bipyrydyną<sup>15</sup>. Stałe trwałości kompleksów zostały obliczone na podstawie pomiarów potencjometrycznych, natomiast trwałość kinetyczną związków została zbadana dzięki wykorzystaniu metody spektroskopowej stopped-flow. Otrzymane dane pozwoliły na wyciągnięcie wniosków odnośnie wpływu rodzaju liganda w sferze koordynacyjnej kompleksu na trwałość badanych połączeń.

W innej grupie badań przy wykorzystaniu metody miareczkowania kalorymetrycznego oraz potencjometrycznego<sup>14</sup> wyznaczone zostały właściwości kompleksotwórcze ligandów diglikolanowego oraz tiodioctanowego względem jonów cynku. Wyniki badań zostały uzupełnione obliczeniami teoretycznymi (*ab initio*, metoda MP2). Opisano zależność między sposobem koordynacji liganda a wartościami wyznaczonych funkcji termodynamicznych.

Oszacowana została również reaktywność diglikolanowych kompleksów wanadylu, kobaltu(II) oraz niklu(II) względem anionorodnika ponadtlenkowego przy wykorzystaniu metody elektrochemicznej (woltamperometria cykliczna)<sup>13</sup>. Ponadto, przy wykorzystaniu testów MTT oraz LDH została zbadana aktywność cytoprotekcyjna tych związków względem



komórek neuronowych myszy (HT22) poddanych stresowi oksydacyjnemu, generowanemu egzogennie za pomocą nadtlenu wodoru. Testy wykazały, że wszystkie badane kompleksy wykazują właściwości ochronne, ale ich aktywność cytoprotekcyjna wyraźnie zależy od stężenia związku. Najniższą aktywnością cytoprotekcyjną charakteryzował się kompleks niklu(II). Można przypuszczać, że właściwości antyutleniające diglikolanowego kompleksu niklu(II) są z nadmiarem kompensowane jego toksycznym wpływem na komórki, szczególnie przy wyższych stężeniach związku.

Dodatkowo swoje zainteresowania naukowe poszerzyłam o związki koordynacyjne platyny(II) i palladu(II), które wykorzystywane są jako potencjalne leki przeciwnowotworowe. W publikacji<sup>16</sup> zostały opisane metody określania cytotoksyczności tych związków.

Inne kierunki prowadzonych przeze mnie badań wiążą się z moimi szerokimi zainteresowaniami dotyczącymi problematyki syntezy, charakterystyki oraz badań kinetyki i ustalania mechanizmów reakcji wychwytu gazów oraz ich uwalniania przez związki koordynacyjne metali przejściowych zawierające organiczne, aktywne biologicznie ligandy<sup>1,2,6,7</sup>.

Przeprowadziłam również syntezę grupy związków koordynacyjnych, gdzie w sferze koordynacyjnej były jony żelaza(III)<sup>8</sup>, chromu(III) oraz kobaltu(III), syntezę biologicznie czynnych ligandów organicznych<sup>3</sup> jak również przebadalam nowo otrzymane związki pod względem właściwości fizykochemicznych<sup>4,5</sup>.

#### Publikacje cytowane

1. **D. Jacewicz**, A. Łapińska, A. Dąbrowska, L. Chmurzyński, "A stopped-flow study on the kinetics and mechanism of CO<sub>2</sub> uptake by *cis*-[Cr(1,10-phenanthroline)<sub>2</sub>(OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sup>+</sup> complex ion", *Trans.Met.Chem.*, 31, 111-117 (2006).
2. **D. Jacewicz**, A. Dąbrowska, A. Łapińska, L. Chmurzyński, "Acid-Catalyzed Hydrolysis of the *cis*-[Cr(phen)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>]<sup>+</sup> Ion Studied by UV-Vis Stopped Flow Spectroscopy", *Trans.Met.Chem.*, 31, 575-579 (2006).
3. A. Dąbrowska, **D. Jacewicz**, A. Chylewska, A. Wojtczak, L. Chmurzyński, "Crystal structures of ethyl 3-azido-2,3-dideoxy-D-arabino-hexopyranoside anomers", *Carbohydr.Res.*, 342, 1450-1455 (2007).
4. A. Chylewska, **D. Jacewicz**, D. Zarzeczkańska, L. Chmurzyński, "Determination of dissociation constants for coordination compounds of Cr(III) and Co(III) using potentiometric and spectrophotometric methods", *J.Chem.Thermodyn.*, 40, 1290-1294 (2008).
5. A. Dąbrowska, M. Makowski, **D. Jacewicz**, A. Chylewska, L. Chmurzyński, "Determination of protolytic equilibria for methyl 3-azido-6-iodo-2,3,6-trideoxy- $\alpha$ -D-arabino-hexopyranoside by *ab initio* and spectrophotometric methods", *J.Mol.Struct.*, 892, 140-145 (2008).
6. **D. Jacewicz**, J. Pranczk, A. Dąbrowska, L. Chmurzyński, "Kinetic studies of acid-catalyzed hydrolysis of the *cis*-[Cr(oxalate)(pyridoxamine)(CO<sub>3</sub>)]<sup>-</sup>", *Reac.Kinet.Mech.Cat.*, 100, 11-20 (2010).
7. **D. Jacewicz**, A. Dąbrowska, L. Chmurzyński, "Stopped-flow spectrophotometrical study of the kinetics and the mechanisms of CO<sub>2</sub> uptake by *cis*-[Cr(C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)(BaraNH<sub>2</sub>)(OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sup>+</sup> cation and acid-catalyzed decomposition of *cis*-[Cr(C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)(BaraNH<sub>2</sub>)OCO<sub>2</sub>]<sup>-</sup> anion in aqueous solution", *Molecules*, 16, 7746-7761 (2011).
8. D. Wyrzykowski, M. Wera, A. Sikorski, **D. Jacewicz**, L. Chmurzyński, "Physicochemical characteristics of 2-,3- and 4-methylpyridinium tetrachloroferrates(III)", *Centr.Europ.J.Chem.*, 9, 1096-1101 (2011).

9. D. Wyrzykowski, D. Zarzecznańska, **D. Jacewicz**, L. Chmurzyński, "Investigation of copper(II) complexation by glycylglycine using isothermal titration calorimetry", *J.Therm. Anal.Calorim.*, 105, 1043-1047 (2011).
10. D. Wyrzykowski, B. Pilarski, **D. Jacewicz**, L. Chmurzyński, "Investigations of metal-buffer interactions using isothermal titration calorimetry", *J.Therm.Anal.Calorim.*, 111, 1829-1836 (2013).
11. K. Żamojć, **D. Jacewicz**, L. Chmurzyński, "Quenching of fluorescence of polycyclic aromatic hydrocarbons by 4-OH-TEMPO", *Anal.Lett.*, 46, 349-355 (2013).
12. K. Żamojć, **D. Jacewicz**, L. Chmurzyński; "Kinetics of reaction between 1,3-diphenylisobenzofuran and NO<sub>2</sub> studied by fluorimetric method", *Res.Chem.Intermet.*, 39, 3023-3031 (2013).
13. D. Wyrzykowski, I. Inkielewicz-Stepniak, J. Czupryniak, **D. Jacewicz**, T. Ossowski, M. Woźniak, L. Chmurzyński, " Electrochemical and biological studies on reactivity of oxydiacetate complexes of oxo-vanadium(IV), nickel(II) and cobalt(II) towards superoxide free radicals", *Z.Anorg.Allg. Chem. (ZAAC)*, 639, 1795-1799 (2013).
14. D. Wyrzykowski, I. Anusiewicz, B. Pilarski, **D. Jacewicz**, L. Chmurzyński, "Investigations of coordinating properties of oxydiacetate and thiodiacetate anions towards Zn<sup>2+</sup> ions in solutions", *Inorg.Chim.Acta*, 405, 163-168 (2013).
15. D. Wyrzykowski, J. Pranczk, **D. Jacewicz**, A. Tesmar, B. Pilarski, L. Chmurzyński, "Investigations of ternary complexes of Co(II) and Ni(II) with oxydiacetate anion and 1,10-phenanthroline or 2,2'-bipyridine in solutions", *Centr.Europ.J.Chem.*, 12, 107-114 (2014).
16. J. Pranczk, **D. Jacewicz**, D. Wyrzykowski, L. Chmurzyński, "Platinum(II) and palladium complex compounds as anti-cancer drugs. Methods of cytotoxicity determination", *Curr.Pharm.Anal.*, 10, 2-9 (2014).
17. K. Żamojć, W. Wicz, B. Zaborowski, **D. Jacewicz**, L. Chmurzyński, „Analysis of fluorescence quenching of coumarin derivatives by 4-hydroxy-TEMPO in aqueous solution”, *J. Fluoresc.*, 24, 713-718 (2014).
18. K. Żamojć, W. Wicz, B. Zaborowski, M. Makowski, J. Pranczk, **D.Jacewicz**, L. Chmurzyński, Fluorescence quenching of fluoroquinolone antibiotics by 4-hydroxy-TEMPO in aqueous solution, *Spectrochim. Acta Part A: Molec.&Biomolec. Spectr.*, 133, 887-891 (2014).
19. D. Wyrzykowski, A. Tesmar, **D. Jacewicz**, J. Pranczk, L. Chmurzyński, "Zinc(II) complexation by some biologically relevant pH buffers" *J. Molec. Recogn.* (DOI 10.1002/jmr.2398, 2014).

## 5. Plany na przyszłość

Aktualnie kontynuuję opisane w autoreferacie badania naukowe, a ich spektrum jest stopniowo poszerzane. Jestem głównym wykonawcą w grantie NCN kierowanym przez Profesora Lecha Chmurzyńskiego pt. „Struktura a właściwości fizykochemiczne i cytoprotekcyjne heteroligandowych kompleksów metali przejściowych”. Tematyka tego grantu dotyczy wpływu struktury oraz właściwości fizykochemicznych małowczątkowych związków koordynacyjnych na ich właściwości cytoprotekcyjne. Kolejny cykl badań dotyczy określenia wpływu na komórki roślinne *Arabidopsis thaliana* L. egzogenne deponowanych związków: nadtlenu wodoru, pirogronianu i glutaminianu, będących w warunkach biologicznych źródłami reaktywnych form tlenu, w obecności nowo zsyntezowanych związków kompleksowych.

Równocześnie biorę udział w drugim projekcie badawczym kierowanym przez dr Dariusza Wyrzykowskiego pt. „Małowczątkowe związki cytoprotekcyjne - struktura oraz fizykochemiczna i biomedyczna charakterystyka polikarboksylianowych związków koordynacyjnych”, w którym również jestem głównym wykonawcą. Tematyka grantu dotyczy istotnych problemów związanych z ochroną zdrowia człowieka. Głównych jej celem jest znalezienie cech strukturalnych i fizykochemicznych jakimi muszą charakteryzować się

związki koordynacyjne, mające pełnić rolę efektywnych mimetyków dysmutazy ponadtlenkowej.

Dodatkowo rozpoczęłam badania naukowe nad tematyką dotyczącą syntezy związków, które będą miały za zadanie pobudzać pracę enzymu, biorącego udział w procesach prowadzących do obniżenia poziomu glukozy we krwi. Prace swoje rozpoczęłam od syntezy związków koordynacyjnych chromu(III) zawierających biologicznie czynne ligandy organiczne. Dlaczego akurat związki koordynacyjne chromu(III)? Dowiedziono, że jon chromu(III) wspomaga działanie insuliny, dlatego też pierwiastek ten ma znaczące działanie biologiczne dla organizmu.

Obecnie badam właściwości fizykochemiczne nowo otrzymanych połączeń. W najbliższej przyszłości planuję rozpocząć badania biologiczne mające na celu sprawdzenie nowo zsyntezowanych związków kompleksowych na liniach komórkowych pod kątem regulacji poziomu cukru, a tym samym ułatwienia przemiany materii i procesów trawiennych.

Dagmara Jarewicz