

Do reaktywnych form tlenu zalicza się m. in.: nadtlenek wodoru ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), rodnik hydroksylowy ( $\text{HO}^\bullet$ ), rodnik alkiloksyłowy ( $\text{RO}^\bullet$ ), rodnik alkiloperoksylowy ( $\text{ROO}^\bullet$ ), anionorodnik ponadtlenkowy ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), anion chloranowy(I) ( $\text{OCl}^-$ ) oraz tlen singletowy ( $^1\text{O}_2$ ), zaś wśród reaktywnych form azotu wymienić można m. in.: tlenek azotu(II) ( $\text{NO}$ ), tlenek azotu(IV) ( $\text{NO}_2$ ) czy anion nadtlenoazotanowy(III) ( $\text{ONOO}^-$ ). Reaktywne formy azotu i tlenu (z ang. RNOS – reactive nitrogen and oxygen species), będące prekursorami stresu komórkowego, są nieustannie produkowane w wyniku metabolizmu komórkowego. Choć RNOS uczestniczą w wielu procesach fizjologicznych, a także pełnią bardzo istotną rolę w procesach normujących komunikację między komórkami, w nadmiarze mogą prowadzić do rozwoju wielu chorób. Udowodniony negatywny wpływ na fizjologię ludzkiego organizmu produkcji nadmiarowych ilości reaktywnych form azotu i tlenu dowodzi, jak istotne znaczenie ma poszukiwanie ich potencjalnych biosensorów, umożliwiających ilościowe oznaczanie oraz unieszkodliwianie tych indywidualów chemicznych.

Badania wykonane w ramach projektu doktorskiego były prowadzone z wykorzystaniem następujących technik analitycznych: spektrofotometria UV-Vis, wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas, a przede wszystkim spektroskopia fluorescencyjna, zarówno w stanie podstawowym, jak i czasowo-rozdzielcza.

Jednym z aspektów prowadzonych przeze mnie eksperymentów była kompleksowa charakterystyka oddziaływań pomiędzy wybranymi RNOS a 1,3-difenyloizobenzofuranem (DPBF), związkiem wykazującym fluorescencję, który przez blisko 20 lat był uważany za wysoce specyficzny względem następujących reaktywnych form tlenu:  $\text{HO}^\bullet$ ,  $\text{RO}^\bullet$ ,  $\text{ROO}^\bullet$ ,  $^1\text{O}_2$ . Jak donosi literatura, produktem reakcji pomiędzy DPBF a tymi reaktywnymi formami tlenu jest 1,2-dibenzoilobenzen (*o*-DBB). Na tej podstawie postanowiłem sprawdzić, czy DPBF daje ten sam produkt w reakcji z pozostałymi reaktywnymi formami tlenu i azotu, a tym samym czy może pełnić rolę potencjalnego biosensora molekularnego sumarycznej zawartości RNOS. W

tym celu zbadalem typ oddziaływań pomiędzy 1,3-difenyloizobenzofuranem a pięcioma innymi (dotąd nieprzebadanymi), występującymi w warunkach fizjologicznych, reaktywnymi formami azotu i tlenu ( $\text{NO}_2$ ,  $\text{ONOO}^-$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{OCl}^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), a także pomiędzy powszechnie występującymi w materiale biologicznym anionami:  $\text{NO}_2^-$  oraz  $\text{NO}_3^-$ . Udowodniłem, że w przypadku sześciu z siedmiu badanych przeze mnie indywiduów produktem reakcji z 1,3-difenyloizobenzofuranem jest 1,2-dibenzoilobenzen. Wykazałem, że jedynie w przypadku oddziaływań pomiędzy DPBF a  $\text{H}_2\text{O}_2$  produktem reakcji jest bifenylo-2,2'-dikarbaldehyd. Ponadto określiłem mechanizm oraz kinetykę tej reakcji, a także wyznaczyłem limit detekcji i oznaczalności nadtlenku wodoru z wykorzystaniem 1,3-difenyloizobenzofuranu. Wyniki przeprowadzonych i opisanych powyżej badań dowodzą, że 1,3-difenyloizobenzofuran jest związkiem wysoce specyficznym w stosunku do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , co umożliwia jego potencjalne wykorzystanie w badaniach biologicznych w celu określenia w komórkach stężenia nadtlenku wodoru.

Innym aspektem prowadzonych przeze mnie badań było określenie oddziaływań pomiędzy serią 16 związków wykazujących fluorescencję a stabilnym rodnikiem nitroksylowym 4-hydroksy-TEMPO, najszerzej przebadaną pod kątem oddziaływań z reaktywnymi formami azotu i tlenu pochodną 2,2,6,6-tetrametylopiperydyny. Przeprowadzenie tych badań miało na celu znalezienie związku, który oddziaływałby z pochodną rodnika nitroksylowego w sposób selektywny lub specyficzny, a tym samym umożliwił jego ilościowe oznaczanie. W przypadku zdecydowanej większości badanych przeze mnie związków (wszystkie wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, wszystkie antybiotyki fluorochinolonowe oraz większość kumaryn) oddziaływania z 4-hydroksy-TEMPO miały charakter czysto fizyczny. Dla związków tych określiłem mechanizm wygaszania fluorescencji (wygaszanie dynamiczne), wyznaczyłem stałe wygaszania Sterna-Volmera oraz stałe szybkości wygaszania fluorescencji. Jedynie w przypadku 6,7-dihydroksykumaryna oraz kilku innych dihydroksylowych pochodnych kumaryny zaobserwowałem wyraźne zmiany w widmie

absorpcji oraz emisji pod wpływem 4-hydrokso-TEMPO (wzrost intensywności fluorescencji na skutek dodania 4-hydrokso-TEMPO oraz nieznaczne przesunięcie pasma emisji fluorescencji kumaryny w kierunku fal dłuższych), co świadczyło o reakcji chemicznej. Udowodniłem, że pod wpływem 4-hydrokso-TEMPO kumaryna ulega dimeryzacji - produkt reakcji zidentyfikowałem z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas. Dodatkowo, wyznaczyłem zakres stężeń 4-hydrokso-TEMPO, dla którego obserwowany był liniowy wzrost intensywności fluorescencji 6,7-dihydroksokumaryny, wyznaczyłem limit detekcji 4-hydrokso-TEMPO oraz potwierdziłem selektywność kumaryny w stosunku do 4-hydrokso-TEMPO. Realizacja tych badań, umożliwiających ilościowe oznaczanie 4-hydrokso-TEMPO, stanowi opracowanie pierwszego etapu pośredniej metody ilościowego oznaczania sumarycznej ilości RNOS w próbkach biologicznych.