

Polska Akademia Nauk

Instytut Fizyki

**Określenie metodami spektroskopowymi struktury
biomateriałów tworzonych na bazie
protoporfiryny IX**

Monika Sylwia Walczak

Rozprawa Doktorska
wykonana pod kierunkiem
prof. dr hab. Krystyny Ławniczak-Jabłońskiej

Warszawa 2009

Podziękowania

Niniejszym pragnę bardzo gorąco podziękować Promotor rozprawy, Pani Profesor Krystynie Ławniczak-Jabłońskiej za zaangażowanie, cenne dyskusje i uwagi, oraz wsparcie mojego rozwoju naukowego.

Pragnę również podziękować obojgu Recenzentom: Panu Dr hab. Wojciechowi Kwiatkowi i Panu Dr hab. Wojciechowi Paszkowiczowi za okazaną życzliwość i poparcie.

Wyrazy wdzięczności kieruję do Pana Dr Andrzeja Sienkiewicza za wprowadzenie w tematykę badań, oraz okazywaną wszechstronną pomoc i zainteresowanie.

Dziękuję także wszystkim członkom zespołu SL1 z Instytutu Fizyki PAN.

Spis treści

Spis rysunków	ix
Spis tablic	x
1 Wstęp	1
1.1 Znaczenie badań związków tworzonych na podstawie protoporfiryny IX	1
1.2 Przegląd ważniejszych odkryć dotyczących struktury pigmentu malarii	7
1.3 Fotouczulacze - rozwój, właściwości i zastosowanie w technikach PDD oraz PDT	9
1.4 Określenie celu i znaczenia przeprowadzonych badań spektros- kopowych	10
2 Eksperyment	11
2.1 Układ do pomiarów metodą XAFS	12
2.2 Charakterystyka i przygotowanie próbek	14
2.2.1 Próbki mikrokryształiczne	14
2.2.2 Roztwory	19
3 Metody teoretyczne analizy danych	21
3.1 Podstawy teoretyczne powstawania struktury subtelnej oraz przykrawędziowej w absorpcyjnej spektroskopii rentgenowskiej	25
3.2 Zastosowane metody i programy	29
3.2.1 Program EXCURVE	29

3.2.2	Program FEFF	33
3.2.3	Program MXAN	33
3.2.4	Porównanie programów EXCURVE FEFF i MXAN w zastosowaniu do EXAFS i XANES	34
4	Analiza danych	36
4.1	Strategie przyjęte do analizy EXAFS związków na bazie protoporfiryny IX	36
4.1.1	Materiały proszkowe	38
4.1.2	Roztwory	47
4.2	Strategia przyjęta do analizy XANES związków na bazie protoporfiryny IX	47
5	Wyniki oraz dyskusja	49
5.1	Struktura substytutu pigmentu malarii jako związku mikro- krystalicznego	49
5.1.1	Analiza widm EXAFS	53
5.1.2	Analiza widm XANES	66
5.2	Struktura cząsteczki substytutu pigmentu malarii w roztworze przed i po reakcji z chlorochiną.	71
5.2.1	Roztwory kwasu octowego	72
5.2.2	Roztwory dimetylosulfotlenku	90
5.3	Proponowane otoczenie atomowe dla pierwiastków ciężkich w moleku- le fotouczulacza.	97
5.3.1	EXAFS	97
5.3.2	XANES	99
6	Podsumowanie	102

Spis rysunków

1.1	Struktura cząsteczkowa protoporfiryny IX.	3
1.2	Przypuszczalny mechanizm niszczenia komórki pasożyta.	4
1.3	Mechanizmy działania chlorochininy.	5
1.4	Zmodyfikowany diagram Jabłońskiego.	7
1.5	Dimerowa cząsteczka hemozoiny. Wiązania mostkowe.	8
2.1	Schemat układu pomiarowego XAFS	12
2.2	Struktura β -hematyny	16
2.3	Struktura meso-hematyny	17
2.4	Nominalna struktura dialaninowej pochodnej PPIX	18
2.5	Holder na cieczy	20
3.1	Elementarne procesy oddziaływania promieniowania el-mag z materią.	22
3.2	Przykładowe widmo XAFS.	22
3.3	Rodzaje przejść fotoelektronów w zależności od energii.	23
3.4	XANES i EXAFS - geneza.	24
3.5	MXAN - schemat działania	34
4.1	Model jednostek strukturalnych.	37
4.2	Strategia I dopasowania EXAFS	38
4.3	Strategia II dopasowania EXAFS	39
4.4	Strategia III dopasowania EXAFS.	40
4.5	Strategia IV dopasowania EXAFS.	41
4.6	Wersja strategii V dopasowania EXAFS.	41
4.7	Wpływ wielokrotnych rozprośnień na widmo EXAFS.	43
4.8	Wpływ liczby atomów rozpraszających na widmo EXAFS.	44
4.9	Wpływ modelu strukturalnym na widmo EXAFS	46
4.10	Strategia dopasowania XANES	48
5.1	Struktura meso-hematyny	52
5.2	Struktura β -hematyny	53
5.3	Meso-hematyna, odległości Fe-Fe	54
5.4	β -hematyna, odległości Fe-Fe	55

5.5	Meso-hematyna, β -hematyna eksperymentalne widma	55
5.6	Meso-hematyna, hematyna eksperymentalne widma	56
5.7	Meso-hematyna dopasowanie	62
5.8	β -hematyna dopasowanie	62
5.9	Hematyna dopasowanie	62
5.10	Hematyna, meso-hemina widma eksperymentalne	65
5.11	Meso-hemina dopasowanie	65
5.12	Meso-hematyna; widmo XANES z zaznaczeniem charakterystycznych struktur	67
5.13	Meso-hematyna β -hematyna XANES widma eksperymentalne . . .	68
5.14	Meso-hematyna hematyna XANES widma eksperymentalne	69
5.15	Meso-hematyna β -hematyna XANES FEFF	70
5.16	Meso-hematyna β -hematyna XANES MXAN	70
5.17	MDAA MDAAQ eksperyment	73
5.18	MDAA30 MDAAQ30 eksperyment	74
5.19	MDAA15 MDAAQ15 eksperyment	74
5.20	Widma eksperymentalne roztworów w kwasie octowym bez chlorochininy	75
5.21	MDAA15 meso-hematyna eksperyment	75
5.22	MDAA MDAAQ dopasowanie	77
5.23	MDAA30 MDAAQ30 dopasowanie	78
5.24	MDAA15 MDAAQ15 dopasowanie	79
5.25	Cząsteczka chlorochininy	80
5.26	MDAA15 XANES charakterystyczne struktury	83
5.27	MDAA MDAAQ XANES eksperyment	84
5.28	MDAA30 MDAAQ30 XANES eksperyment	84
5.29	MDAA15 MDAAQ15 XANES eksperyment	85
5.30	MDAA XANES bez obecności chlorochininy	85
5.31	MDAA XANES w obecności chlorochininy	86
5.32	MDAA15 meso-hematyna XANES porównanie	87
5.33	Doming effect	87
5.34	FEFF dopasowanie dla MDAA15	88
5.35	MXAN dopasowanie dla MDAA15	89
5.36	MXAN wybrane modele ze względu na osiowy atom tlenu.	90
5.37	MDDMSO MDDMSOQ EXAFS widma eksperymentalne	91
5.38	MDDMSO EXAFS dopasowanie	92
5.39	MDDMSOQ EXAFS dopasowanie	93
5.40	DMSO XANES porównanie	95
5.41	FEFF policzony XANES dla MDDMSO MDDMSOQ	96

5.42	MXAN dopasowany XANES dla MDDMSO MDDMSOQ	97
5.43	PPIXALA dopasowanie	99
5.44	PPIXALA XANES widmo eksperymentalne	100
5.45	PPIXALA XANES FEFF	100
5.46	PPIXALA XANES MXAN	100

Spis tabel

5.1	Odległości od Fe dla meso- i β -hematyny - dane krystalograficzne. .	51
5.2	Parametry dopasowania strategią I	56
5.3	Parametry kątowe - dane krystalograficzne.	57
5.4	Parametry dopasowania strategią II	58
5.5	Parametry dopasowania strategią III	59
5.6	Parametry dopasowania strategią IV	59
5.7	Parametry dopasowania strategią V	60
5.8	Parametry dopasowania hemozoiny i β -hematyny - inny pomiar . .	63
5.9	Meso-hemina parametry dopasowania	66
5.10	Meso-hematyna XANES parametry dopasowania przez MXAN . . .	71
5.11	MDAA MDAAQ parametry dopasowania	76
5.12	MDAA30 MDAAQ30 parametry dopasowania	78
5.13	MDAA15 MDAAQ15 parametry dopasowania	79
5.14	MDAA MDAA30 MDAA15 meso-hematyna porównanie	82
5.15	MDAA15 XANES dopasowanie MXAN	89
5.16	MXAN wybrane modele parametry dopasowania	89
5.17	MDDMSO MDDMSOQ EXAFS parametry dopasowania.	92
5.18	MDDMSO meso-hematyna porównanie	94
5.19	MDDMSO MDDMSOQ MXAN parametry dopasowania	97
5.20	Parametry dopasowania odległości i czynników Debye-Wallera dla alaninowej pochodnej.	98
5.21	Parametry dopasowania XANES dla widma PP(Ala) ₂	101

Rozdział 1

Wstęp

Abstrakt

We wstępie krótko opisano rolę i wielość zastosowań związków, w których skład wchodzi porfiryna. Zdefiniowano pojęcie protoporfiryna IX. Omówiono znaczenie i zastosowanie dwóch typów związków o strukturze cząsteczki, której podstawą lub prekursorem jest protoporfiryna IX. Są to syntetyczne odpowiedniki pigmentu malarii - hemozoiny, oraz aminokwasowe pochodne protoporfiryny IX. Określono cel i znaczenie przeprowadzonych badań spektroskopowych.

Związki, w których występuje pierścień porfirynewy, takie jak: chlorofil, hem, cytochromy, peroksydazy, kobalaminy czy koenzymy korynowe odgrywają niebagatelną rolę w środowisku naturalnym i życiu organizmów. Odpowiadają za procesy fotosyntezy, transportu i magazynowania tlenu, fermentacji, transferu elektronów, a także funkcje regulacji i sterowania metabolizmem. Porfiryny są bardzo reaktywne i biorą udział w różnorodnych typach reakcji chemicznych, m.in.: reakcjach agregacji, koordynacji, polimeryzacji, redukcji i utleniania, a także w przemianach fotochemicznych. Dzięki temu, że wykazują zdolność do fotoemisji i fotoprzewodnictwa są niezbędne w procesach ewolucji organizmów żywych. Porfiryny i ich metalopochodne są wykorzystywane w przemyśle do produkcji katalizatorów różnego typu reakcji, barwników, oraz półprzewodników i fotoprzewodników, zaś w medycynie, jako sensybilizatory i jako kontrast w rezonansie magnetycznym. Niniejsza praca dotyczy dwóch typów związków o strukturze cząsteczki opartej na protoporfirynie IX. Są to syntetyczne odpowiedniki pigmentu malarii, oraz aminokwasowe pochodne protoporfiryny IX.

1.1 Znaczenie badań związków tworzonych na podstawie protoporfiryny IX

Pierścień protoporfiryny IX (protoporfiryna IX - PPIX) składa się z czterech pierścieni pirolowych połączonych mostkami metinowymi. Do pierścienia PPIX dołączone są cztery grupy metylowe $-\text{CH}_3$, dwie grupy winylowe $-\text{CH}=\text{CH}_2$ i dwie grupy propylowe $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}^-$. Możliwych jest wiele sposobów numeracji atomów w

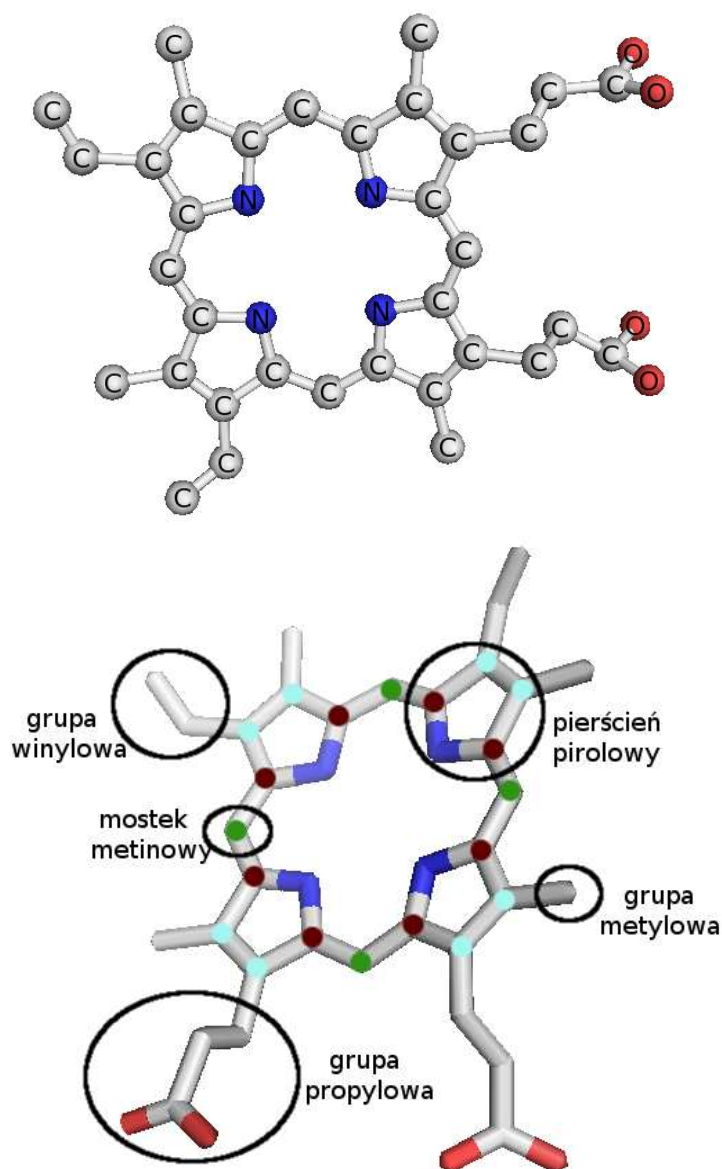
cząsteczce PPIX. W niniejszej pracy posłużono się częstym w literaturze oznaczeniem węgla przy pomocy liter greckich: α , β i przedrostka meso. Przy numerowaniu poszczególnych atomów PPIX nie posługiwano się numeracją według IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) ze względu na znacznie wygodniejszy dla zastosowanej metody badawczej sposób numerowania atomów w zależności od odległości od metalicznego (Fe) centrum protoporfiryny IX. Budowa cząsteczki PPIX i sposób oznaczenia grup atomów węgla są przedstawione na rys. 1.1.

Syntetyczne odpowiedniki hemozoiny - naturalnego produktu pasożyta malarii należą do pierwszego typu związków zbudowanych w oparciu o strukturę cząsteczki PPIX omawianych w rozprawie. Reprezentują je:

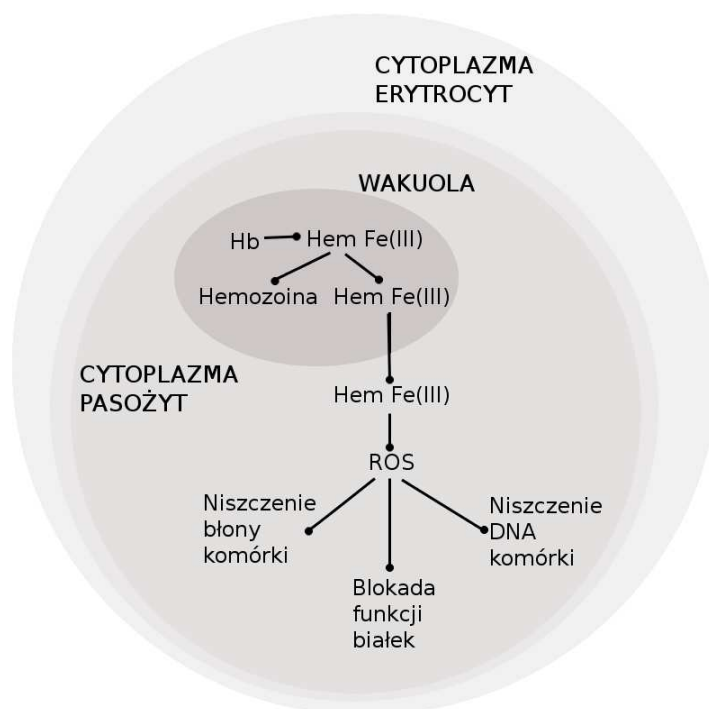
- Iron(III)(protoporphyrin-IX anhydride) - β -hematyna o strukturalnym wzorze cząsteczki $C_{68}H_{62}N_8O_8Fe_2$, oraz
- Iron(III) (mesoporphyrin-IX anhydride) - meso-hematyna o wzorze strukturalnym cząsteczki $C_{68}H_{70}N_8O_8Fe_2$

Iron(III) oznacza atom żelaza na trzecim stopniu utlenienia. Struktura cząsteczki meso-hematyny, a dokładnie struktura PPIX w cząsteczce tego materiału podlega pewnym modyfikacjom, dzięki którym w przeciwieństwie do swojego naturalnego odpowiednika - hemozoiny oraz syntetycznej β -hematyny jest ona dużo łatwiej rozpuszczalna w słabych kwasach i innych związkach organicznych. Na rozpuszczalność tego związku wpływa również inny sposób łączenia cząsteczek. Modyfikacja w strukturze cząsteczki meso-hematyny polega na dodaniu kationu wodorowego do grup winylowych PPIX. Ze względu na lepszą rozpuszczalność tego materiału możliwe jest przeprowadzenie badania reakcji jego pojedynczej cząsteczki w roztworach, zarówno z cząsteczkami roztworu jak i cząsteczkami antymalarycznych leków. W przedstawionej rozprawie badano reakcje cząsteczek meso-hematyny z cząsteczkami chlorochininy - jednego z najwcześniej stosowanych antymalarycznych leków.

Mechanizm działania chlorochininy na poziomie molekularnym nie jest jednoznacznie wyjaśniony do tej pory. Wiadomo, że lek ten przenika do komórki pasożyta malarii rezydującej w erytrocycie swego żywiciela i wpływa na przebiegające w niej procesy chemiczne. Pasożyt malarii w czasie jednego ze swoich stadiów rozwojowych przebywa w erytrocytowej ludzkiej komórce krwi i tam poprzez pinocytozę (pobieranie płynów i substancji odżywczych przez wpuklenie błony komórkowej do wnętrza komórki) wchłania hemoglobinę z komórki żywiciela. W komórce pasożyta wiele z powstałych w procesie pinocytozy pęcherzy zawierających hemoglobinę łączy się z wakuolą żywieniową (z ang. food vacuole) o kwaśnym odczynnikiem wnętrza [1]. Wewnątrz wakuoli hemoglobina ulega transformacji do methemoglobiny dzięki kwasowości środowiska a następnie jest hydrolizowana przez enzymy do cząsteczki hemu i do zdenaturowanej otoczki białkowej. Ta ostatnia jest następnie hydrolizowana do białek, które przeniesione do cytoplazmy komórki pasożyta ulegają hydrolizie do aminokwasów stanowiących podstawę budowy własnych białek organizmu pasożytniczego [2]. Pozostałe w wakuoli cząsteczki hemu ulegają utlenieniu i przybierają formę hematyny, heminy lub uwodnionej żelazowej protoporfiryny IX z atomem żelaza na trzecim stopniu utlenienia [3]. Dla potrzeb tej pracy zostały one określone wspólną nazwą



Rysunek 1.1. Struktura cząsteczki protoporfiryny IX bez uwzględnienia atomów wodoru. U góry: model atomowej struktury cząsteczki PPIX. Kolorem niebieskim oznaczono atomy azotu, czerwonym atomy tlenu a szarym atomy węgla. U dołu: model strukturalny, w którym wyróżnione zostały grupy: propylowa $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}^-$, winylowa $-\text{CH}=\text{CH}_2$, metylowa $-\text{CH}_3$. Kółkami koloru bordowego zaznaczono węgle nazywane α , kółkami koloru zielonego atomy węgla meso, które stanowią jednocześnie mostki metinowe, a kolorem błękitnym węgle o nazwie β .



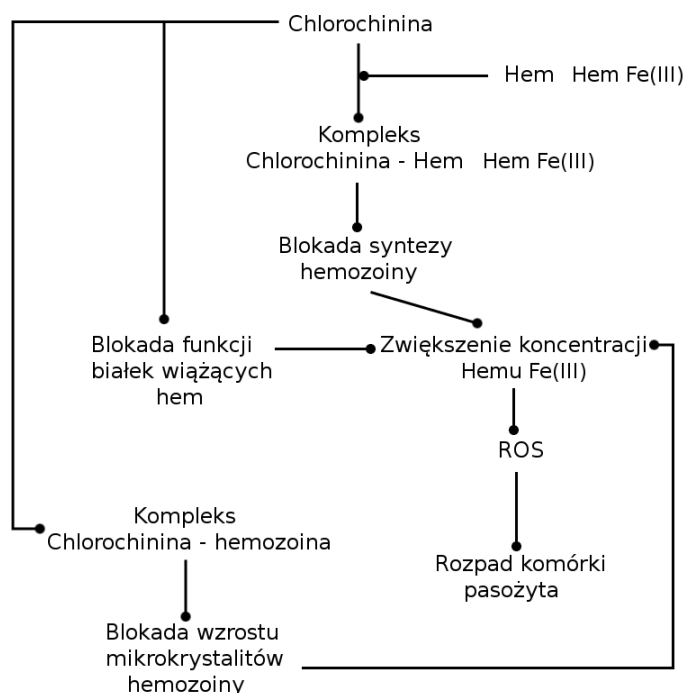
Rysunek 1.2. Schemat przedstawiający przypuszczalny mechanizm doprowadzenia do zniszczenia komórki pasożyta zapoczątkowany obecnością w niej uwolnionego z hemoglobiny toksycznego hemu Fe(III).

Hem Fe(III). Z wakuoli pasożyta mogą przenikać do cytoplazmy jego komórki. Są bardzo toksyczne, ponieważ mogą indukować reakcje prowadzące do wytworzenia wolnych rodników - ROS (z ang. reactive oxygen species) [4] i w efekcie powodować rozpad komórki pasożyta [5, 6]. Schemat procesu doprowadzającego do rozpadu komórek pasożyta przez uwolnienie hemu jest przedstawiony na rys. 1.2.

Pasożyt wykształcił pewne unikalne systemy obrony przed toksycznym hemem poprzez tworzenie mikrokrystalicznego materiału - hemozoiny w wakuoli żywieniowej [7, 8], oraz poprzez jego wiązanie przez białka [9] czy degradację przez oddziaływanie z H_2O_2 w cytoplazmie komórki [10].

Z dotychczas przeprowadzonych badań wynika, że chlorochinina akumuluje się przede wszystkim w wakuoli pasożyta malarii [11, 12], czyli miejscu powstawania toksycznego Hemu Fe(III). Przypuszcza się zatem, że blokuje mechanizm tworzenia hemozoiny.

Pierwsza z propozycji działania cząsteczek chlorochininy to wiązanie ich do struktury już utworzonego mikrokryształitu hemozoiny w taki sposób, by zostało zablokowane przyłączanie kolejnych cząsteczek toksycznego Hemu Fe(III) [13]. Wskazuje na to spowolnienie lub zatrzymanie wzrostu kryształu hemozoiny w obecności chlorochininy [14]. Druga hipoteza zakłada, że chlorochinina nie tworzy bezpośrednio kompleksów z toksycznym hemem, ale wpływa pośrednio na zwiększenie ilości toksycznego wolnego hemu Fe(III) zarówno w wakuoli jak i cytoplazmie komórki pasożyta [15]. Miałoby to miejsce w przypadku np. wpływu chlorochininy na funkcje białek pasożyta wiążących FePPIX [7, 16]. Pojawiła się również trzecia propozycja postulująca wiązanie chlorochininy z pierścieniem PPIX hemu lub



Rysunek 1.3. Proponowane mechanizmy działania chlorochininy w komórce pasożyta.

Hemu Fe(III) niezwiązanego jeszcze w strukturę hemozoiny [17], przy czym taki kompleksowy związek pozostawałby toksyczny dla komórki pasożyta. Wszystkie powyżej przedstawione mechanizmy działania chlorochininy, rys. 1.3, prowadzą do zachowania FePPIX w formie toksycznej, co w konsekwencji powoduje zniszczenie komórki pasożyta.

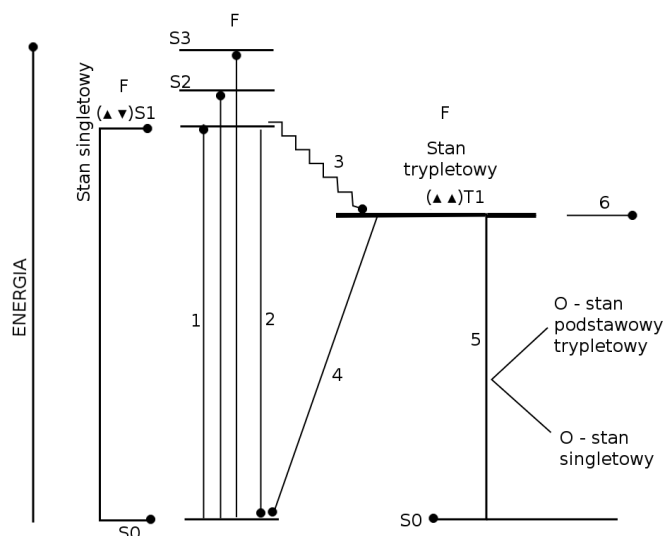
Bardzo często proponowanym wiązaniem kompleksu FePPIX i chlorochininy jest tzw. wiązanie π - π płaszczyzny cząsteczki chlorochininy z płaszczyzną pierścienia PPIX. Wiązanie π - π jest niekowalencyjne, charakterystyczne dla związków aromatycznych i powstaje przez przekrycie orbitali typu π , należących do aromatycznych pierścieni atomów azotu i węgla. Z kolei orbital π powstaje przez przekrywanie atomowych orbitali typu p powyżej i poniżej płaszczyzny pierścienia aromatycznego. Propozycje tego typu kompleksu dotyczą najczęściej wiązania pierścienia FePPIX, który nie jest wbudowany w strukturę mikrokrystaliczną [18, 19, 20]. Tego typu wiązanie zostało również zaproponowane dla kompleksu chlorochininy z cząsteczką μ -oxo dimeru PPIX [21, 22]. Jednak, ani obecność μ -oxo dimeru PPIX, ani jego kompleksu z antymalarycznym lekiem nie prowadziłyby do wytworzenia wolnych rodników w komórce pasożyta. Co więcej istnieją doniesienia o braku μ -oxo dimeru PPIX w roztworach wodnych, [23], a badania krystalograficzne (XRD) syntetyzowanego dimerowego związku w środowisku zbliżonym do warunków fizjologicznych wakuoli żywieniowej komórki pasożyta wykazały obecność dimeru typu β -hematyna, [24].

Z uwagi na coraz częstsze występowanie odpornych na chlorochininę (oraz inne leki wywodzące się od chininy) szczepów pasożyta malarii [25] niezbędne jest wyjaśnienie mechanizmu działania substancji antymalarycznych na poziomie molekularnym. Pozwoli to na syntezę nowych i udoskonalenie już używanych leków an-

tymalarycznych. Znalezienie skutecznej metody leczenia malarii jest niezwykle istotne. Każdego roku dochodzi do ponad 500 milionów zakażeń ze skutkiem śmiertelnym dla 1-3 milionów ludzi [26].

Na bazie pierścienia protoporfiryny IX zbudowane są także cząsteczki wspomnianych już aminokwasowych pochodnych PPIX. Pierścień PPIX jest w nich zmodyfikowany w ten sposób, że cząsteczki kwasów aminowych zastępują grupy propylowe. Związki te spełniają wymagania stawiane fotouczulaczom (fotosensybilizatorom) - substancjom używanym w leczeniu i diagnostyce nowotworów. Związki zbudowane w oparciu o strukturę cząsteczki porfirynewej wykazują zdolność do gromadzenia się w szybko rozwijających się tkankach nowotworowych. Po wzbudzeniu wyższych stanów elektronowych tak nagromadzonych cząsteczek przez wiązkę fotonów o odpowiedniej długości fali (światło widzialne lub nadfiolet) następuje fluorescencja jak również zapoczątkowanie kaskady reakcji chemicznych, prowadzących do zniszczenia tych tkanek. Zjawiska te znalazły zastosowanie w nowoczesnych metodach wykrywania i leczenia nowotworów takich jak diagnostyka i terapia fotodynamiczna, odpowiednio PDD (z ang. Photodynamic diagnosis) i PDT (z ang. Photodynamic Therapy) [27, 28]. Diagnostyka PDD polega na wywołaniu zjawiska fluorescencji indukowanej w molekułę fotouczulacza. Metoda PDD daje możliwość wysoce wybiórczej identyfikacji zmiany nowotworowej, dzięki selektywnemu gromadzeniu się fotouczulacza w zmienionej nowotworowo tkance. Terapia PDT, oparta na zjawisku wywołania reakcji chemicznych, po wzbudzeniu fotouczulacza, prowadzących do wytworzenia reaktywnych cząsteczek, pozwala przede wszystkim na selektywne niszczenie tkanki nowotworowej, bez zbędnych uszkodzeń zdrowych tkanek. Niszczenie tkanki nowotworowej następuje w procesie selektywnego fotoutlenienia, wymagającego trzech podstawowych składników: fotouczulacza, zwanego też fotosensybilizatorem, selektywnie gromadzącego się w tkance nowotworowej i uczulającego ją na działanie światła, obecności tlenu, oraz źródła światła emitującego fale będące w rezonansie z pasmami absorpcji danego fotouczulacza.

Wyższe stany elektronowe cząsteczki fotouczulacza, absorbując fotony światła o odpowiedniej długości fali ulegają wzbudzeniu najpierw do stanów singletowych (czas życia takiego stanu to $\sim 1\text{ns}$) a następnie do stanu trypletowego o dłuższym czasie życia ($\sim 10\mu\text{s}$) poprzez tzw. przejście interkombinacyjne z najniższego stanu wzbudzonego singletowego. Molekuła fotouczulacza będąc w takiej postaci jest zdolna do bezpromienistego przekazania energii cząsteczkom związków ośrodka (poprzez przekazanie jonu wodoru lub przekazanie/przyjęcie elektronu), także cząsteczkom tlenu, rys. 1.4 [27, 28, 29]. Prowadzi to do powstawania mocno reaktywnych, toksycznych dla komórek form silnie reagujących, czyli wolnych rodników tlenowych, w tym tlenu singletowego [30]. Tlen singletowy powstaje z cząsteczki tlenu, będącego w podstawowym stanie trypletowym, w wyniku przekazania energii od cząsteczki fotouczulacza, będącej we wzbudzonym stanie trypletowym. Cząsteczka tlenu odbierając energie od cząsteczki fotouczulacza przechodzi w singletowy stan wzbudzony, a fotouczulacz wraca do swego stanu podstawowego - singletowego. W warunkach, gdy stężenie tlenu w środowisku reakcji jest obniżone, reakcja fotoutleniania przebiega poprzez wytworzenie form wolnorodnikowych. Wolne rodniki fotouczulacza i substratu powstają w wyniku przeniesienia kationu

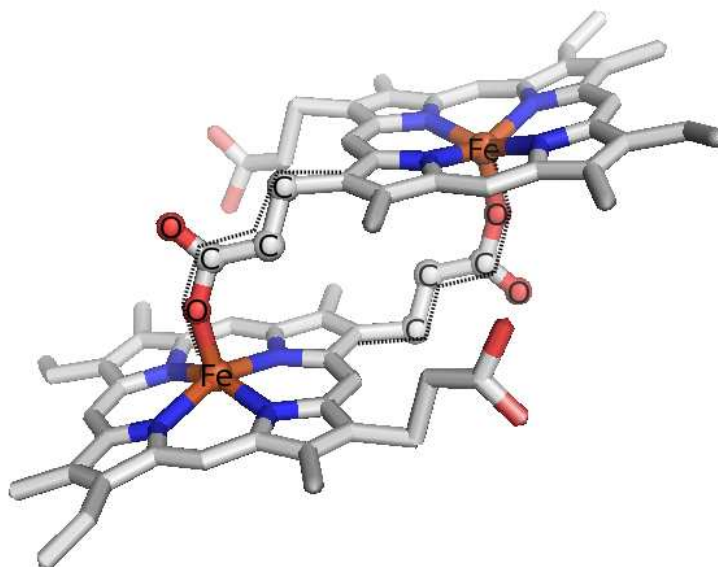


Rysunek 1.4. Zmodyfikowany diagram Jabłońskiego dla fotouczulacza porfirynowego. 1 - absorpcja fotonu i przejście ze stanu podstawowego S0 do stanów wzbudzonych S1 S2 S3 ... fotouczulacza F, 2 - fluorescencja (PDD), 3 - przejście interkombinacyjne, 4 - fosforescencja, 5 - powstanie tlenu singletowego - fotoprocess typu II, 6 - transfer jonu wodorowego lub elektronu od fotouczulacza F do innej cząsteczki - fotoprocess typu I

wodorowego lub elektronu między cząsteczką wzbudzonego fotouczulacza a substratem, czyli tkanką nowotworową, w której biegnie reakcja fotochemiczna lub cząsteczką roztworu. Dominującym mechanizmem fotoutleniania dla alaninowych pochodnych PPIX jest ten, w wyniku którego tworzy się tlen singletowy (fotoprocess typu II). Jednak stosunek udziałów opisanych mechanizmów zależy od wielu czynników. Mogą nimi być parametry środowiska, takie jak stężenie tlenu, stałe dielektryczne tkanek, pH i inne. O typie mechanizmu decyduje również struktura fotouczulacza. W ogólności fotouczulacze porfirynowe wykazują większe tendencje do generacji tlenu singletowego [27].

1.2 Przegląd ważniejszych odkryć dotyczących struktury pigmentu malarii

Pigment malarii - hemozoina jest końcowym produktem powstałym w procesie przetwarzania toksycznego hemu Fe(III) obecnego w wakuoli pasożyta malarii po hydrolizie hemoglobiny znajdującej się w komórkach erytrocytowych krwi. Produkt ten jest wytworem pasożytów malarii m.in. *Plasmodium falciparum* czy *Plasmodium Bergei*, ale też mało z nimi skoligaconych robaka obłego *Schistosoma mansoni* oraz pluskwy *Rhodius prolixus*. Zjawisko występowania w komórkach erytrocytów ludzkich czarnego mikrokryształicznego materiału (pigmentu malarii - hemozoiny) zostało po raz pierwszy opisane w 1717 roku w książce Giovanni Maria Luncisi [31] i wyprzedziło odkrycie samego pasożyta malarii o około 150 lat. W początkowych badaniach materiał ten uważano za melaninę stąd też tradycyjna jego nazwa - pigment malarii. Dopiero w 1911 roku Wade H Brown [32] zauważył,



Rysunek 1.5. Struktura cząsteczki hemozoiny z zaznaczeniem atomów należących do wiązań mostkowych.

że podstawę materiału stanowi grupa hemowa, czyli pierścień protoporfiryny IX. A w niespełna 80 lat później Fitch i Kanjananggulpan [33] zapostulowali, że materiał ten składa się wyłącznie z protoporfiryny IX z centralnym atomem żelaza na stopniu utlenienia 3+ i posiada najprawdopodobniej identyczna strukturę jak β -hematyna - słabo rozpuszczalny mikrokryształiczny materiał opisany po raz pierwszy w 1936 roku [34]. Śladem tym poszli Slater i in., którzy w 1991 opublikowali [35] wyniki rentgenowskich badań dyfrakcyjnych, badań optycznych w zakresie podczerwieni oraz analizy absorpcyjnej spektroskopii rentgenowskiej wskazujące na bardzo duże podobieństwo struktury hemozoiny i β -hematyny. W 1997 Bohle i in. [36] potwierdzili identyczność struktury obydwu związków za pomocą wysokorozdzielczych synchrotronowych badań dyfrakcji rentgenowskiej, a następnie w 2000 roku na podstawie szczegółowej analizy tychże przez Pagole i in. [37] została rozwiązana mikrokryształiczna struktura hemozoiny. Cząsteczka tego związku podobnie jak cząsteczka β -hematyny składa się z dwóch cząsteczek protoporfiryny IX powiązanych ze sobą przez dwa tzw. mostki tlenowe stanowiące połączenie atomu żelaza jednego pierścienia protoporfiryny IX przez grupę propylową drugiego pierścienia PPIX z tym właśnie PPIX, rys. 1.5. Cząsteczki te nazwano dimerami ze względu na podwójne występowanie w nich protoporfiryny IX. Dimery łączą się pomiędzy sobą poprzez wiązania wodorowe grup propylowych. To odkrycie obaliło zdecydowanie poprzednio wysuwane hipotezy, że cząsteczki protoporfiryny IX w strukturze hemozoiny łączą się w łańcuchy polimerowe poprzez wiązanie żelaza jednej PPIX z atomem tlenu grupy propylowej kolejnej PPIX.

Wyznaczenie atomowego otoczenia żelaza w strukturze cząsteczki syntetycznego odpowiednika hemozoiny - meso-hematyny w postaci mikrokryształicznej, oraz rozpuszczonego w organicznych rozpuszczalnikach, jest przedmiotem znacznej części tej rozprawy.

1.3 Fotouczulacze - rozwój, właściwości i zastosowanie w technikach PDD oraz PDT

Fotouczulacze lub fotosensybilizatory to związki o molekułach absorbujących światło o specyficznej dla nich długości fali (zakres widzialny i nadfiolet) i przekazujące innym cząsteczkom energię w ten sposób uzyskaną. Występują w naturalnym środowisku, najczęściej w roślinach, gdzie uczestniczą w procesie fotosyntezy. Do celów PDD i PDT wykorzystywane są jednak najczęściej fotouczulacze syntezowane sztucznie. Pierwszym fotouczulaczem dopuszczonym przez FDA (Food and Drug Administration) w USA do oficjalnego stosowania w medycynie był oligomer hematoporfiryny znany pod nazwą Photofrin [38]. Używany jest do tej pory, najczęściej w terapii nowotworu płuc we wczesnym i późnym stadium, nowotworów pęcherza moczowego, zaawansowanych nowotworów przełyku czy nowotworów krtani we wczesnym stadium. Ma on jednak dwie podstawowe wady [39, 40]. Pierwszą z nich jest długi okres akumulacji Photofrinu w tkankach - nawet do dziesięciu tygodni po iniekcji. Drugą jest efektywność - najczęściej jest wzbudzany w zakresie swego najslabszego piku absorpcyjnego. Należy do grupy fotouczulaczy pierwszej generacji. Związek, którego analizę budowy cząsteczki jego półproduktu analizowano w niniejszej pracy należy już do fotouczulaczy drugiej generacji. Fotouczulacze generacji drugiej charakteryzują się krótszym okresem akumulacji w tkankach (nie dłużej niż kilka dni) i dłuższym czasem życia stanu trypletowego fotouczulacza, w porównaniu z fotouczulaczami generacji pierwszej. Należą do nich m.in. glikozydowane porfiryny, tetrasulfofenyloporfiryna czy ftalocyjaniny cyrkonu i hafnu [41, 42, 43]. Niektóre z fotouczulaczy drugiej generacji charakteryzują się większym współczynnikiem absorpcji w zakresie 600-800nm jak np. Verteporfin [44] i wzbudzanie w tym zakresie pozwala na głębszą penetrację tkanki. Alaninowa pochodna protoporfiryny IX: PP(Ala)₂(Arg)₂ posiada piki absorpcyjne ~400nm, ~500nm, ~530nm, ~630nm a fluorescencyjne ~615nm i ~675nm. Jest wzbudzana w zakresie ~400nm. W tkankach zdrowych organizmu (np. skóra) pozostaje do czterech dni. Wykazuje wysoką skuteczność niszczenia komórek nowotworowych (powyżej 95 procent) z pobranych próbek komórek nowotworu krtani i przełyku człowieka, nowotworu okrężnicy oraz skóry (czerniak). [Niepublikowane dane prof. A. Graczyk, Instytut Optoelektroniki Wojskowa Akademia Techniczna]. Trzecią generację fotouczulaczy stanowią związki, które kumulują się tylko lub w wysokim procencie w tkance nowotworu, a w zdrowych tkankach w minimalnej ilości lub wcale. Wymaga to połączenia porfiryny lub ftalocyjaniny ze specyficzną cząsteczką (liposomy immunoglobiny czy albuminy osocza). Pozwala to na zmniejszenie dawki zaamplikowanego fotouczulacza. Ze względu na fizyczne i chemiczne właściwości fotouczulaczy można je podzielić na hydrofobowe - nierozpuszczalne w wodzie i wiążące się z lipidami, hydrofilowe - rozpuszczalne w wodzie z tendencją do lokowania się w hydrofilowych częściach komórki, oraz amfifilowe, które mają w swojej strukturze cząsteczki grupy zarówno hydrofobowe jak i hydrofilowe. PP(Ala)₂(Arg)₂ należy do związków amfifilowych. Związek ten może się kumulować w strukturach lipidowych ze względu na obecność w jego strukturze aminokwasów a jednocześnie dzięki obecności argininy może występować w środowisku wodnym.

1.4 Określenie celu i znaczenia przeprowadzonych badań spektroskopowych

Celem przeprowadzonych badań spektroskopowych cząsteczek związków będących syntetycznymi odpowiednikami pigmentu malarii było:

- potwierdzenie podobieństwa struktury cząsteczek meso-hematyny do cząsteczek syntetycznie wyprodukowanej β -hematyny, której struktura została uznana [37] za identyczną do struktury hemozoiny - naturalnego produktu malarii. Potwierdzenie podobieństwa struktur pozwoli na badanie reakcji antymalarycznych leków z protoporfiryną IX w roztworach, ponieważ meso-hematyna jest znacznie łatwiej rozpuszczalna w organicznych rozpuszczalnikach od β -hematyny i hemozoiny.
- zbadanie lokalnego otoczenia żelaza dla rozpuszczalnego syntetyku hemozoiny - meso-hematyny w roztworach kwasu octowego bez i z dodatkiem wody, oraz w roztworze dimetylosulfotlenku
- zbadanie lokalnego otoczenia żelaza dla rozpuszczalnego syntetyku hemozoiny - meso-hematyny w wyżej wymienionych roztworach po dodaniu chlorochininy.

Wykazane zmiany w bliskim otoczeniu atomowym Fe mogłyby świadczyć o bezpośrednim oddziaływaniu chlorochininy na pierścień PPIX i przyczynić się do wyjaśnienia mechanizmu działania tego leku na poziomie molekularnym.

Celem przeprowadzonych badań spektroskopowych związku diaminokwasowej pochodnej PPIX, będącego półproduktem kandydata na fotouczulacz w diagnostyce PDD i terapii PDT nowotworów było:

- znalezienie miejsca wiązania atomów żelaza i bromu w strukturze diaminokwasowej pochodnej PPIX.

Atomy ciężkie w strukturze tego związku są niepożądane i znajomość ich pozycji w strukturze cząsteczki badanego materiału pozwoli na opracowanie bardziej efektywnych i ekonomicznych metod oczyszczania. Jedynie produkt bez tych pierwiastków może być dopuszczony do zastosowań klinicznych i znaleźć się na liście rekomendowanych fotouczulaczy.

Rozdział 2

Eksperyment

Abstrakt

Omówiono technikę pomiarową absorpcji rentgenowskiej w modzie transmisyjnym i fluorescencyjnym. Przedstawiono układy pomiarowe trzech stacji: A1 w Hasy-lab, oraz BM26A i ID26 w ESRF, na których zmierzono pokazane i zanalizowane w niniejszej pracy eksperymentalne widma XAFS. Zamieszczono opis i sposób przygotowania próbek proszkowych, jak również roztworów w kwasie octowym i dimetylosulfotlenku.

Przedmiotem pomiaru w absorpcyjnej rentgenowskiej technice XAFS (z ang. X-ray Absorption Fine Structure) jest współczynnik absorpcji promieniowania rentgenowskiego $\mu(E)$ danego materiału w funkcji energii wiązki padających fotonów. Promieniowanie rentgenowskie mieści się w zakresie energetycznym od około 500eV do 500keV, co przekłada się na długość fali elektromagnetycznej w zakresie od 25Å do 0.25Å. W takim zakresie fotony są absorbowane przez materię głównie w wyniku wewnętrznego efektu fotoelektrycznego poprzez przekazanie energii fotonu elektronowi znajdującemu się w stanie mocno związanym jak 1s czy 2p. Zgodnie z prawem Beer’a współczynnik $\mu(E)$ wskazuje na prawdopodobieństwo zaabsorbowania części fotonów z przechodzącej przez próbkę wiązki elektromagnetycznego promieniowania rentgenowskiego [45, 46].

$$I = I_0 e^{-\mu t}, \quad (2.1)$$

gdzie I_0 to intensywność promieniowania padającego na badany materiał, I to intensywność promieniowania wychodzącego z próbki a t grubość próbki. Eksperyment w modzie transmisyjnym polega zatem na pomiarze intensywności promieniowania padającego na materiał I_0 i promieniowania wychodzącego z badanego materiału I_t . Współczynnik absorpcji dla każdej wartości energii wiązki padających fotonów liczony jest z równania [45, 46]:

$$t\mu(E) = -\ln(I_t/I_0), \quad (2.2)$$

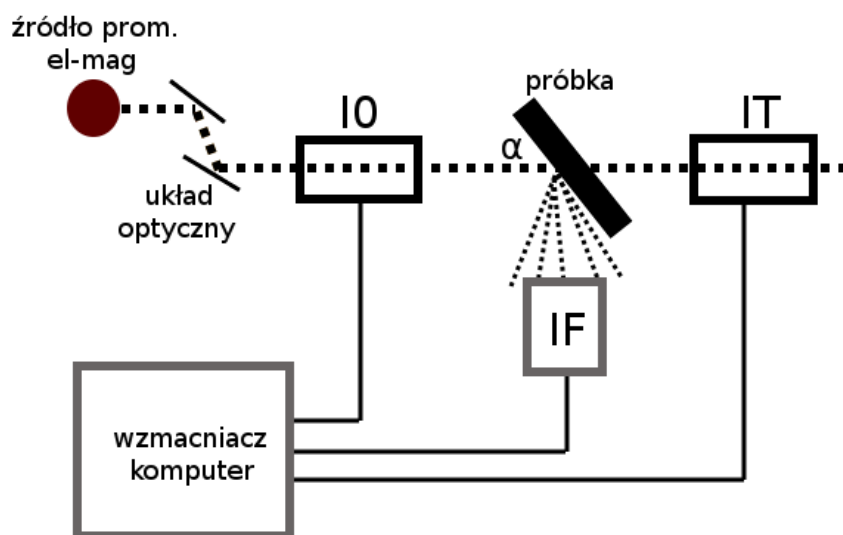
W przypadku, gdy cała wiązka lub znaczna jej część jest absorbowana w materiale pomiary są przeprowadzane w modzie fluorescencyjnym, bądź w modzie

prądowym TEY (z ang. total electron yield). W modzie fluorescencyjnym mierzy się intensywność wtórnej wiązki I_f fotonów wychodzących z próbki w zakresie wybranej energii fluorescencji powstałej w trakcie powrotu wzbudzonego atomu do stanu podstawowego, oraz intensywność promieniowania padającego na materiał I_0 . W tym wypadku współczynnik absorpcji dla każdej mierzonej energii wyznacza się stosując równanie [46]:

$$\mu(E) = I_f/I_0, \quad (2.3)$$

Pokazane i analizowane w pracy widma absorpcyjne w zakresie rozciągniętej struktury EXAFS (z ang. Extended X-ray Absorption Fine Structure) i przykrawędziowej struktury XANES (z ang. X-ray Absorption Near Edge Spectroscopy) zostały zmierzone w modach zarówno transmisyjnym jak i fluorescencyjnym w zależności od zawartości absorbującego atomu w próbce. Ze względu na to, że próbkowanym stanem atomu był 1s żelaza, jako źródło promieniowania rentgenowskiego wykorzystano źródło synchrotronowe. Charakteryzuje się ono wiązką o dużej intensywności w szerokim zakresie energetycznym, co było szczególnie istotne przy pomiarach roztworów.

2.1 Układ do pomiarów metodą XAFS



Rysunek 2.1. Uproszczony schemat układu pomiarowego XAFS. I0 - komora jonizacyjna do pomiaru intensywności padającej na próbkę wiązki fotonów, IT - komora jonizacyjna do pomiaru intensywności wiązki po przejściu przez badany materiał. IF - detektor fotonów, α kat ustawienia płaszczyzny próbki w stosunku do padającego na nią promieniowania. Pomiędzy źródłem promieniowania elektromagnetycznego a komorą jonizacyjną znajduje się układ optyczny kształtujący wiązkę.

Schematyczny, uproszczony układ do pomiarów XAFS został przedstawiony na rys. 2.1. Rentgenowska wiązka fotonów powstałych w wyniku ugięcia wiązki elek-

tronów albo pozytronów przez pole magnetyczne elektromagnesów uginających, lub magnesów stałych wigglera bądź undulatora zostaje kierowana poprzez układ optyczny na próbkę. W wykonanych eksperymentach była to wiązka o wycinanym przez monochromator bardzo wąskim przedziale długości fali, tak by mogła być uznana za monochromatyczną. Do pomiaru intensywności wiązki wykorzystano komory jonizacyjne umieszczone na drodze wiązki fotonowej przed i za próbką. Ilość fotonów promieniowania fluorescencyjnego z próbki była zliczana przez detektor półprzewodnikowy. Sposób detekcji w tego typu detektorach opiera się na zjawisku kreowania par elektron-dziura [47, 48]. Elektrony zostają wzbudzone z poziomów walencyjnych i przenoszone w pasmo przewodnictwa. Liczba wykreowanych par jest proporcjonalna do energii fotonu, ponieważ energia kreacji pary elektron-dziura jest charakterystyczna i stała dla danego materiału w danej temperaturze (dla germanu wynosi 2.95eV w temperaturze 80K). Materiał półprzewodnika znajduje się w polu elektrycznym co pozwala na pomiar prądu elektronowego bądź dziurowego. Elektryczny sygnał z komór jonizacyjnych i detektora półprzewodnikowego fluorescencyjnego był następnie wzmacniany, konwertowany z analogowego na cyfrowy i przekazywany do komputera. Widma analizowane w pracy zmierzone zostały na trzech różnych stacjach pomiarowych o następującej charakterystyce:

stacja A1, synchrotron Hasylab w Hamburgu [49]

Miejsce powstania wiązki: magnes uginający

Intensywność wiązki: 10^8 - 10^9 [foton/sekunda]

Monochromator: Si 111 z użyciem modu dwukrystalicznego dla uzyskania wiązki monochromatycznej z przedziału 7-8.1keV

System detekcji: 7-elementowy germanowy detektor fluorescencyjny HPGE z aktywną powierzchnią 100mm^2 na pojedynczy element

Komora na próbki: próżnia (uzyskana przy użyciu pomp turbomolekularnych) do wartości ciśnienia 10^{-6} mbar, aluminiowy holder na próbki, pozwalający na zmianę kąta płaszczyzny próbki w stosunku do wiązki, chłodzony do temperatury ciekłego azotu poprzez tzw. zimny palec

Rodzaj mierzonych próbek: żadne z przedstawionych widm w pracy nie pochodzi z pomiarów na tej stacji. Jednak eksperyment na niej wykonany pozwolił na opanowanie techniki pomiaru próbek w postaci roztworu. Ze względu na nieznaną dokładnie koncentrację rozpuszczonych cząsteczek badanego materiału w roztworach (standardowe pomiary koncentracji nie zostały wykonane - mała ilość roztworu) oceniono, czy sygnał z danej próbki jest wystarczająco silny, by pominąć sygnał rozproszony od materiałów, z których zbudowany był holder, oraz ściany komory, w której umieszczano próbki.

stacja BM26A, synchrotron ESRF w Grenoble [50]

Miejsce powstania wiązki: magnes uginający

Intensywność wiązki: 10^{11} [foton/sekunda]

Monochromator: Si(111) w modzie dwukrystalicznym dla pomiaru w zakresie 7-8.1keV, $dE/E = 2 \times 10^{-4}$

System detekcji: 9-elementowy germanowy detektor fluorescencyjny

Komora na próbki: komora próżniowa z helowym kriostatem pozwalająca na zmrozenie próbek do temperatury 12K

Rodzaj mierzonych próbek: wszystkie próbki w postaci proszkowej.

stacja ID26, synchrotron ESRF w Grenoble [51]

Miejsce powstania wiązki: trzy niezależne mechanicznie undulatory; ciągła zmiana odległości magnesów w undulatorze pozwala na szybki pomiar XAFS

Intensywność wiązki: 10^{13} [foton/sekunda]

Monochromator: Si(111) w modzie dwukrystalicznym, zakres energii 7-8.1keV, $dE/E = 1.4 \times 10^{-4}$

System detekcji: 13-elementowy germanowy detektor fluorescencyjny

Komora na próbki: komora próżniowa z kriostatem helowym pozwalającym na schłodzenie próbki do 10K

Rodzaj mierzonych próbek: wszystkie próbki w postaci roztworu.

2.2 Charakterystyka i przygotowanie próbek

Próbki proszkowe syntetyków pigmentu malarii zostały zsyntezowane i poddane puryfikacji w laboratoriach chemicznych na Wydziale Chemii Uniwersytetu McGill w Montrealu w Kanadzie w grupie dr D.S. Bohle'a.

Próbka materiału będącego półproduktem potencjalnego fotouczulacza została wyprodukowana i oczyszczona w laboratoriach Instytutu Optoelektroniki Wojaskowej Akademii Technicznej przy współpracy z grupą prof. A. Graczyk.

Przygotowanie próbek do pomiaru techniką XAFS sprowadzało się do spreparowania pastylek z materiałów proszkowych, a w przypadku roztworów rozpuszczenia w odpowiedniej proporcji w wybranym rozpuszczalniku. Przyjęto założenie, że otrzymane do badań techniką XAFS próbki proszkowe są jednorodne i niezanieczyszczone.

2.2.1 Próbki mikrokrystaliczne

Metodą rentgenowskiej spektroskopii absorpcyjnej przebadano pięć następujących mikrokrystalicznych próbek:

- meso-hemina; Iron(III) (mesoporphyrin-IX chloride) $C_{34}H_{36}N_4O_4FeCl$
- hematyna; Iron(III) (protoporphyrin IX hydroxide) $C_{34}H_{33}N_4O_5Fe$
- β -hematyna ; Iron(III)(protoporphyrin-IX anhydride) $C_{68}H_{62}N_8O_8Fe_2$
- meso-hematyna; Iron(III) (mesoporphyrin-IX anhydride) $C_{68}H_{70}N_8O_8Fe_2$

- dialaninowa pochodna PPIX $C_{38}H_{34}N_6O_8$

meso-hemina

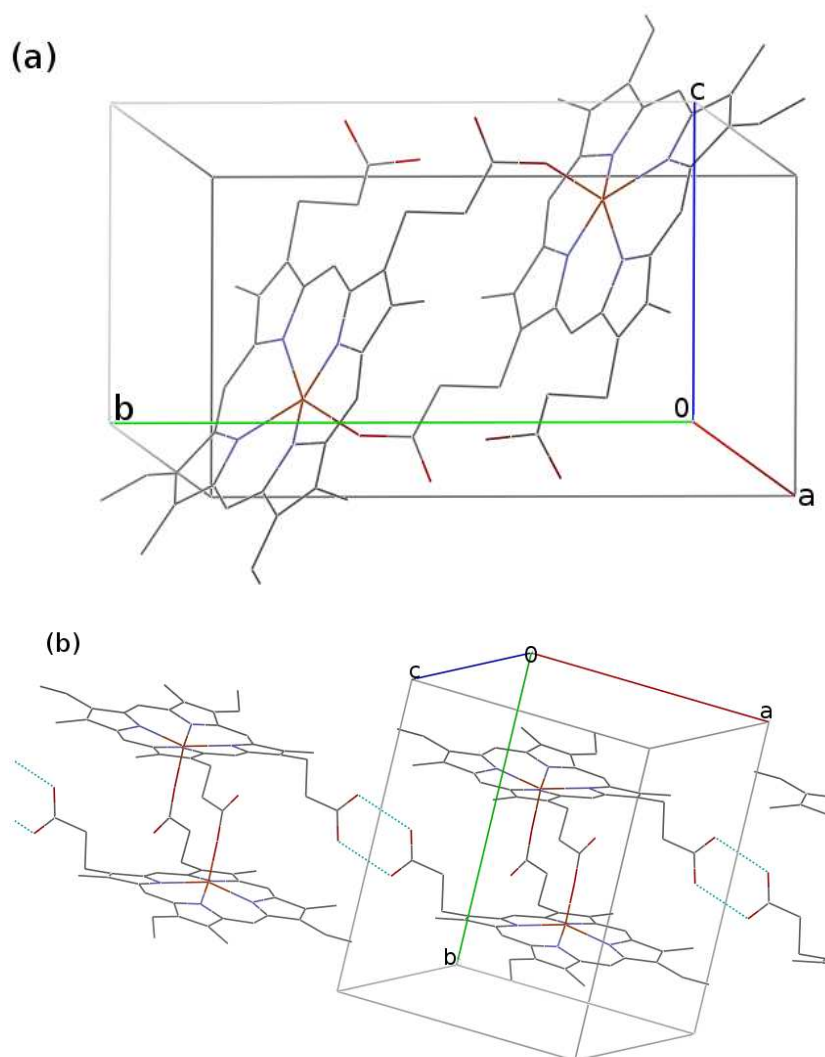
Związek o strukturze cząsteczki takiej jak protoporfiryna IX dla atomów pierścienia. Jednakże w przeciwieństwie do PPIX jego cząsteczka ma grupy winylowe z dodatkowym jonem wodorowym, oraz posiada atom żelaza wraz z ligandem chloru w centrum pierścienia. Próbką wytworzona w laboratorium chemicznym w grupie D.S. Bohla.

hematyna

Związek o strukturze cząsteczki opartej na budowie cząsteczki protoporfiryny IX. Posiada atom żelaza (w centrum pierścienia) z ligandem w postaci atomu tlenu. Zakupiony w Alfa-Aesar i traktowany jako związek referencyjny.

β -hematyna

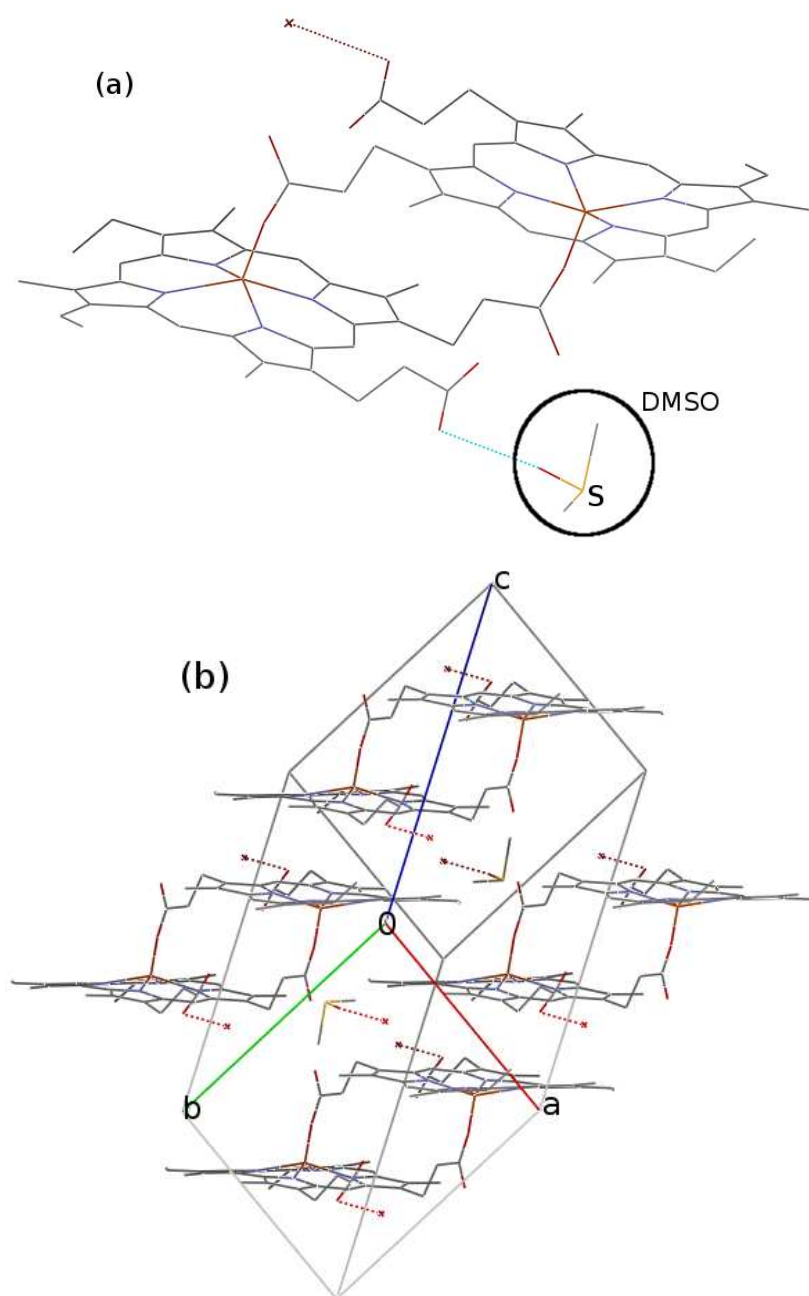
Cząsteczka tego związku, rys. 2.2a, jest złożona z dwóch cząsteczek PPIX. W każdym z pierścieni PPIX znajduje się atom żelaza w centralnej pozycji i posiada tlenowy ligand. FePPIX są połączone ze sobą przez wiązania tak zwanego mostka tlenowego, które tworzy atom żelaza jednej z FePPIX, oraz grupa propylowa należąca do drugiej FePPIX. Związek ten został wytworzony w laboratorium grupy D.S. Bohle'a według metody opisanej przez D. Scott Bohle'a i in. [52]. W obojętnym środowisku gazowym rozpuszczono heminę w minimalnej ilości 2,6-lutydyny i umieszczono w wirówce. Następnie dodano mieszaninę (w proporcji 1:1) niewodnego metanolu oraz dimetylusulfotlenku. Tak przygotowany roztwór był przechowywany i chroniony przed wilgocią oraz światłem przez czas od kilku tygodni do kilku miesięcy. Po tym czasie roztwór był filtrowany by otrzymać z niego stałą substancję. Ta z kolei była traktowana metanolem, 0.1M roztworem sodowego dwuwęglanu i wodą destylowaną do wypłukania czystego materiału. Otrzymane mikrokryształy suszono przez około 12 godzin w temperaturze 150°C. Nie jest to jedyna syntetyczna metoda wytworzenia β -hematyny i kryształy z niej uzyskane różnią się wielkością od krysztalitów uzyskanych inną metodą - przez powolne odkładanie β -hematyny w środowisku kwasowym [53]. W metodzie niezastosowanej do syntezy otrzymanych do badań próbek występuje stan przejściowy pomiędzy hemina i β -hematyna i jest to tzw. μ -oxo dimer. Związku o takiej budowie cząsteczki nie zarejestrowano wewnątrz komórki erythrocytu podczas procesu tworzenia hemozyny [24]. Ze względu na metodę syntezy założono, że brak go również w badanym materiale doświadczalnym. Badania krystalograficzne [37] klasyfikują β -hematynę do grupy symetrii (według notacji H-M) P-1 z komórką elementarną o wymiarach: $a = 12.196(2)$, $b = 14.684(2)$, $c = 8.040(1)$, $\alpha = 90.22(1)$, $\beta = 96.80(1)$, $\gamma = 97.92(1)$. Krystalograficzne dane dotyczące β -hematyny znajdują się w bazie CCDC (Cambridge Crystallographic Data Centre). Strukturę łańcucha dimerowych cząsteczek, połączonych wiązaniami wodorowymi pomiędzy grupami propylowymi przedstawiono na tle komórki elementarnej na rys. 2.2b.



Rysunek 2.2. (a) budowa dimerowej cząsteczki β -hematyny złożonej z dwóch pierścienia porfiryńowych połączonych mostkami tlenowymi w komórce elementarnej, (b) łańcuch dimerowych cząsteczek z zaznaczeniem komórki elementarnej

meso-hematyna

Cząsteczka tego związku jest złożona z dwóch cząsteczek PPIX, rys. 2.3a z grupami winylowymi z obecnością dodatkowego jonu wodorowego i atomem żelaza wraz z tlenowym ligandem. Podobnie jak w cząsteczce β -hematyny FePPIX łączą się ze sobą poprzez tlenowe wiązania mostkowe zawierające atom żelaza jednej z FePPIX oraz atomy grupy propylowej należące do struktury drugiej FePPIX. Dokładna metoda wytworzenia związku, tak by był rozpuszczalny w organicznych rozpuszczalnikach nie zostanie omówiona ze względu na to, że nie została jeszcze opublikowana. Wiadome jest jednak, że meso-hematyna została wytworzona na bazie meso-heminy w podobny sposób jak β -hematyna z heminy. W strukturze meso-hematyny obecna jest cząsteczka dimetylosulfotlenku (DMSO). Przekazane przez D.S. Bohle'a dane krystalograficzne charakteryzują komórkę elementarną



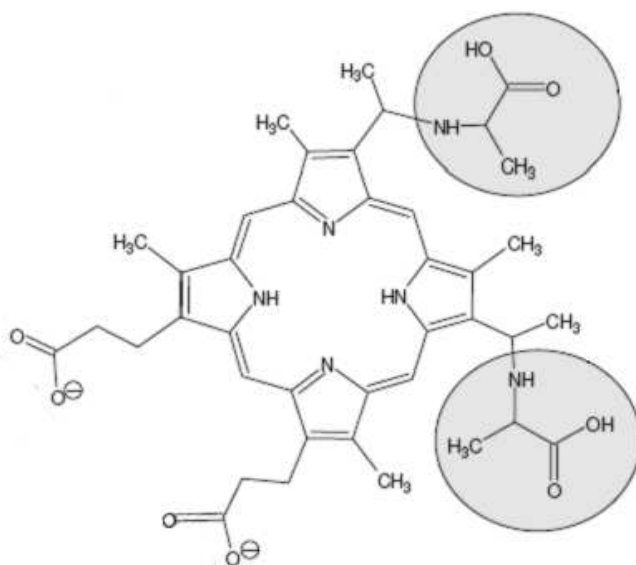
Rysunek 2.3. (a) budowa dimerowej cząsteczki meso-hematyny złożonej z dwóch zmodyfikowanych pierścieni protoporfiryny IX połączonych mostkami tlenowymi. Zaznaczono obecność cząsteczki DMSO. (b) dimerowe cząsteczki meso-hematyny upakowane w komórce elementarnej

związku w następujący sposób: $a = 9.96735(32)$, $b = 11.4584(4)$, $c = 20.1178(8)$, $\alpha = 123.7776(20)$, $\beta = 112.6987(19)$, $\gamma = 86.3963(22)$ przy grupie symetrii P-1. W strukturze meso-hematyny dimerowe cząsteczki nie formują łańcuchów. Wiążą się poprzez wiązania wodorowe jedynie z cząsteczką dimetylosulfotlenku. Struktura upakowania cząsteczek meso-hematyny na tle komórki elementarnej została pokazana na rys. 2.3b. Meso-hematyna, która w przeciwieństwie do β -hematyny

jest rozpuszczalna w rozpuszczalnikach organicznych została wykorzystana w produkcji roztworów.

dialaninowa pochodna PPIX - PP(Ala)₂

Związek będący półproduktem PP(Ala)₂(Arg)₂ - kandydata na fotouczulacz drugiej generacji w fotodynamicznej diagnostyce i terapii chorób nowotworowych. Został zsyntezowany z heminy jako wyjściowego produktu. Nominalna budowa jego cząsteczki została przedstawiona na rys. 2.4. Do struktury protoporfiryny PPIX a dokładnie do dwóch grup winylowych zostały dołączone dwie cząsteczki alaniny typu L. Cząsteczka z założenia nie zawiera metalicznego centrum pierścienia PPIX związanego z czterema azotami pierścienia, ani atomu metalu związanego z jakimkolwiek innym atomem PPIX. Z obecności krawędzi K absorpcji, charakterystycznych dla żelaza i bromu wynika, że podany nominalny model budowy cząsteczki jest niekompletny.



Rysunek 2.4. Nominalna struktura cząsteczki dialaninowej pochodnej PPIX. Na szarym tle pokazano dwie cząsteczki alaniny typu L. Brak atomów pierwiastków ciężkich.

Wszystkie powyżej opisane związki proszkowe były przygotowywane do badań w postaci pastylek. Odpowiednia ilość proszku, policzona na podstawie zakładanego strukturalnego wzoru chemicznego danego materiału (użyto wolnodostępnego programu XAFSMAS [54]) została zmieszana z celulozą - materiałem zawierającym jedynie atomy lekkie takie jak tlen, węgiel i wodór. Tak uzyskaną mieszaninę wkładano do formy i ściskano pod ciśnieniem do uzyskania pastylki o 1 cm średnicy i 1mm grubości. Tak przygotowany materiał jest jednorodny w próbkowanej objętości i daje optymalny wzrost głównej krawędzi absorpcji widma (powyżej 0.5). Wszystkie próbki proszkowe mierzono w modzie transmisji.

2.2.2 Roztwory

Przygotowano następujące roztwory meso-hematyny używając jako rozpuszczalnika kwasu octowego:

- meso-hematyna rozpuszczona w 99.9 procentowym kwasie octowym – próbkę oznaczono jako MDAA,
- meso-hematyna rozpuszczona w 99.9 procentowym kwasie octowym z chlorochiną - MDQAA,
- meso-hematyna rozpuszczona w 99.9 procentowym kwasie octowym z dodatkiem wody w stosunku objętościowym 30:1 - MDAA30,
- meso-hematyna rozpuszczona w 99.9 procentowym kwasie octowym z dodatkiem wody w stosunku objętościowym 30:1 i dodatkiem chlorochiny - MDQAA30,
- meso-hematyna rozpuszczona w 99.9 procentowym kwasie octowym z dodatkiem wody w stosunku objętościowym 15:1 - MDAA15,
- meso-hematyna rozpuszczona w 99.9 procentowym kwasie octowym z dodatkiem wody w stosunku objętościowym 15:1 i dodatkiem chlorochiny - MDQAA15

Każdy z powyższych roztworów był przygotowywany w ten sposób, aby koncentracja meso-hematyny wynosiła 5 mmol. Jeżeli roztwór zawierał chlorochinę to koncentracja molowa tego związku była ta sama, po to by każda cząsteczka meso-hematyny mogła być związana z jedną cząsteczką chlorochiny. Meso-hematyna w zapodanej ilości nie rozpuściła się jednak całkowicie w roztworach, co znacznie wpływało na kształt tła mierzonego widma. Konieczne okazało się użycie nylonowego filtra o przepuszczalności $0.2\mu\text{m}$. Po filtrowaniu szacowane przez Arona Kosara (z grupy S.D. Bohle'a) stężenie molowe meso-hematyny wynosiło około 0.4 mmol w każdym z powyższych roztworów.

Przygotowano również następujące roztwory meso-hematyny używając jako rozpuszczalnika dimetylosulfotlenku:

- meso-hematyna rozpuszczona w dimetylosulfotlenku - MDDMSO
- meso-hematyna rozpuszczona w dimetylosulfotlenku z dodatkiem chlorochiny - MDDMSOQ

Podobnie jak dla roztworów kwasu octowego również w dimetylosulfotlenku rozpuszczono meso-hematynę w takiej ilości, by uzyskać roztwór 5 mmol. W przypadku roztworu z chlorochiną jej stężenie również wynosiło 5 mmol. Oba roztwory wymagały filtrowania filtrem $0.2\mu\text{m}$. Końcowa koncentracja nie została oszacowana. W roztworze z dodatkiem chlorochiny jest ona niższa, ponieważ zaobserwowano wytrącanie ziaren po dodaniu antymalarycznego leku. Świadczy to prawdopodobnie o tworzeniu się dużych agregatów cząsteczek FePIX pod wpływem

działania antymalarycznego leku lub agregatów FePPIX z cząsteczkami chlorochininy.

Zarówno w kwasie octowym jak i dimetylosulfotlenku rozpuszczalność chlorochininy była dobra i jej koncentracja w roztworze pozostawała taka jak zaplanowano.

Roztwory przed pomiarem były umieszczane w specjalnie zaprojektowanym holderze na ciecz i szybko zmrażane do temperatury 80K przez włożenie holderu cieczowego z próbką do ciekłego azotu. Pomiary przeprowadzono w modzie fluorescencyjnym.

Holder na ciecz został zaprojektowany i wykonany w Instytucie Fizyki PAN. Jest to jednolity prostopadłościan z wyciętym centralnie otworem o średnicy 1 cm oraz wydrążonymi dwoma małymi otworami o średnicy 0.8 mm. Centralny otwór po oklejeniu holderu taśmą kaptonową jest zbiornikiem na badaną ciecz, natomiast jeden z mniejszych otworów wprowadza ciecz do zbiornika a drugi wyprowadza powietrze w trakcie napełniania cieczą holderu, rys. 2.5.



Rysunek 2.5. Holder cieczowy. Po lewej fotografia holderu oklejonego taśmą kaptonową oraz wypełnionego badanym roztworem. Na górnym brzegu holderu widoczna jest warstwa kleju, którym zaklejono otwory do wprowadzania roztworu i wyprowadzania powietrza. Po prawej fotografia wykonana podczas napełniania oklejonego taśmą kaptonową holderu przez jeden z otworów w holderze.

Holder na ciecz wykonano z PEEKu - polieteroeteroketonu. Jest to materiał zawierający wyłącznie pierwiastki lekkie (węgiel, tlen), wytrzymały na działanie niskiej temperatury i niereagujący z wykorzystywanymi rozpuszczalnikami organicznymi.

Rozdział 3

Metody teoretyczne analizy danych

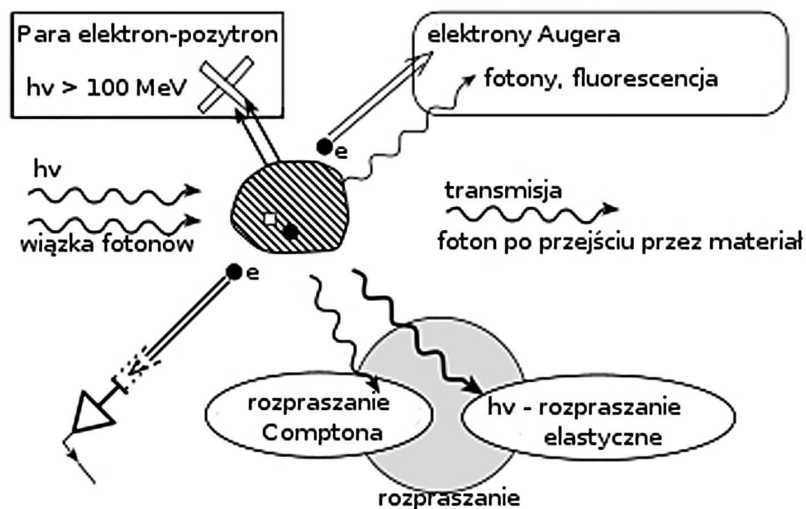
Abstrakt

W rozdziale opisano fizyczne zjawisko absorpcji fal elektromagnetycznych w zakresie energii rentgenowskich w materiałach, a także przedstawiono podstawy teoretycznego opisu struktury przykrawędziowej, oraz rozciągniętej struktury subtelnej występującej w absorpcyjnym widmie XAFS. Szczegółowo omówiono interpretacje i zastosowanie równania EXAFS. Przytoczono opis metod teoretycznych i numerycznych, na bazie których oparte są zastosowane programy analizujące EXAFS i XANES.

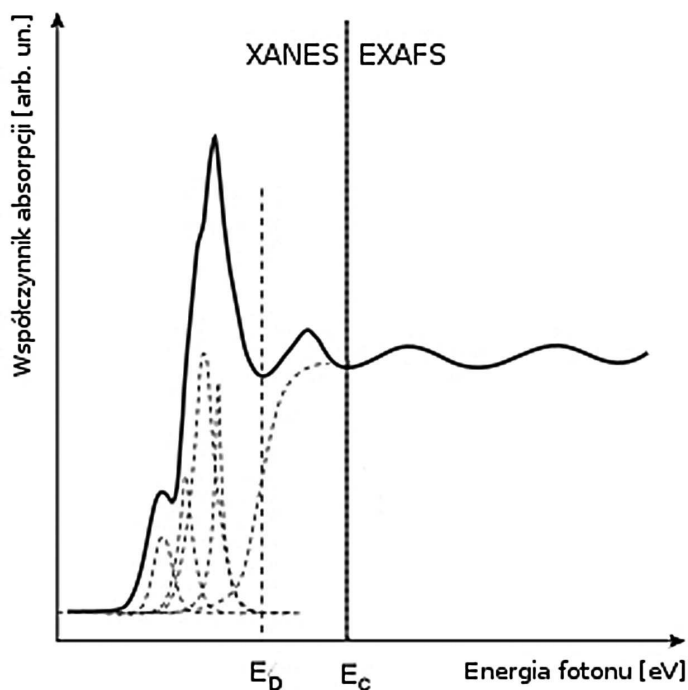
Przy użyciu metody XAFS przeprowadzone zostały pomiary współczynnika absorpcji w omówionych w rozdziale drugim materiałach. XAFS wykorzystuje zjawisko oddziaływania z badanym materiałem wiązki fotonów, wytworzonej najczęściej przez źródło synchrotronowe. Foton w materii może ulec absorpcji, rozproszeniu Comptona lub rozproszeniu elastycznemu, a także wziąć udział w procesie wytworzenia pary elektron-pozytron, rys. 3.1.

Wszystkie te procesy wpływają na osłabienie wiązki fotonowej przechodzącej przez materię a tym samym decydują o współczynniku absorpcji mierzonym w funkcji energii padającej wiązki fotonowej. W mierzonym zakresie energetycznym od 7 do 8 keV, potrzebnym na wzbudzenie najsilniej związanego z atomem żelaza elektronu w stanie $1s$ dominuje zjawisko wewnętrznego efektu fotoelektronowego w materiałach zawierających atomy tego ciężkiego pierwiastka. Zaabsorbowanie fotonu przez atom powoduje jego przejście w stan wzbudzony, wskutek przekazania energii elektronowi zajmującemu odpowiedni poziom energetyczny (najczęściej $1s$ $2s$ $2p$). Taki elektron zostaje przeniesiony na wyższy niezajęty stan elektronowy danego atomu, lub do stanu continuum i będzie dalej nazywany fotoelektronem. Powrót atomu do stanu podstawowego następuje przez emisję fotonów (fluorescencja), bądź tzw. elektronów Augera. Wraz ze wzrostem liczby atomowej Z wzrasta prawdopodobieństwo wystąpienia zjawiska fluorescencji. Jeżeli wiązka fotonów jest w całości lub znacznym procencie absorbowana przez materiał to pośrednią metodą pomiaru współczynnika absorpcji jest pomiar fluorescencji, bądź elektronów Augera. Przykładowe widmo rentgenowskiej absorpcji przedstawiono na rys. 3.2.

Dla każdego widma XAFS można wyróżnić część XANES oraz EXAFS. Podział

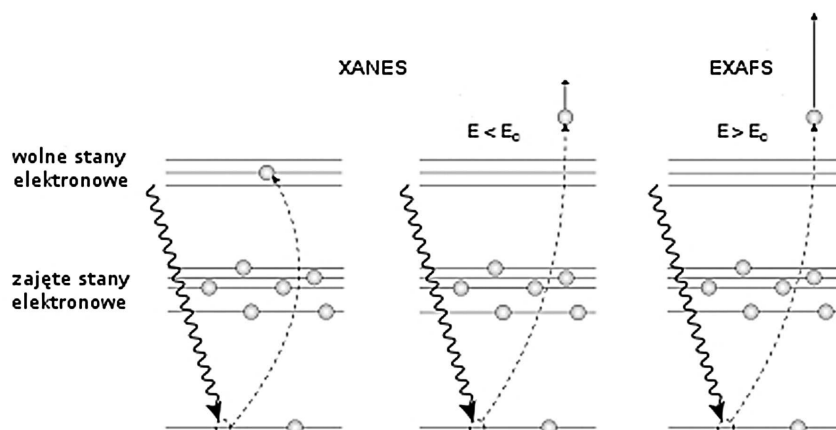


Rysunek 3.1. Podstawowe procesy zachodzące podczas oddziaływania wiązki fotonów z materiałem.



Rysunek 3.2. Przykładowe widmo XAFS z uwzględnieniem podziału na XANES i EXAFS. E_D jest energią fotonów, przy której wzbudzony fotoelektron posiada energię kinetyczną wystarczającą na osiągnięcie stanu continuum a E_C wyznacza granice pomiędzy obszarami XANES i EXAFS.

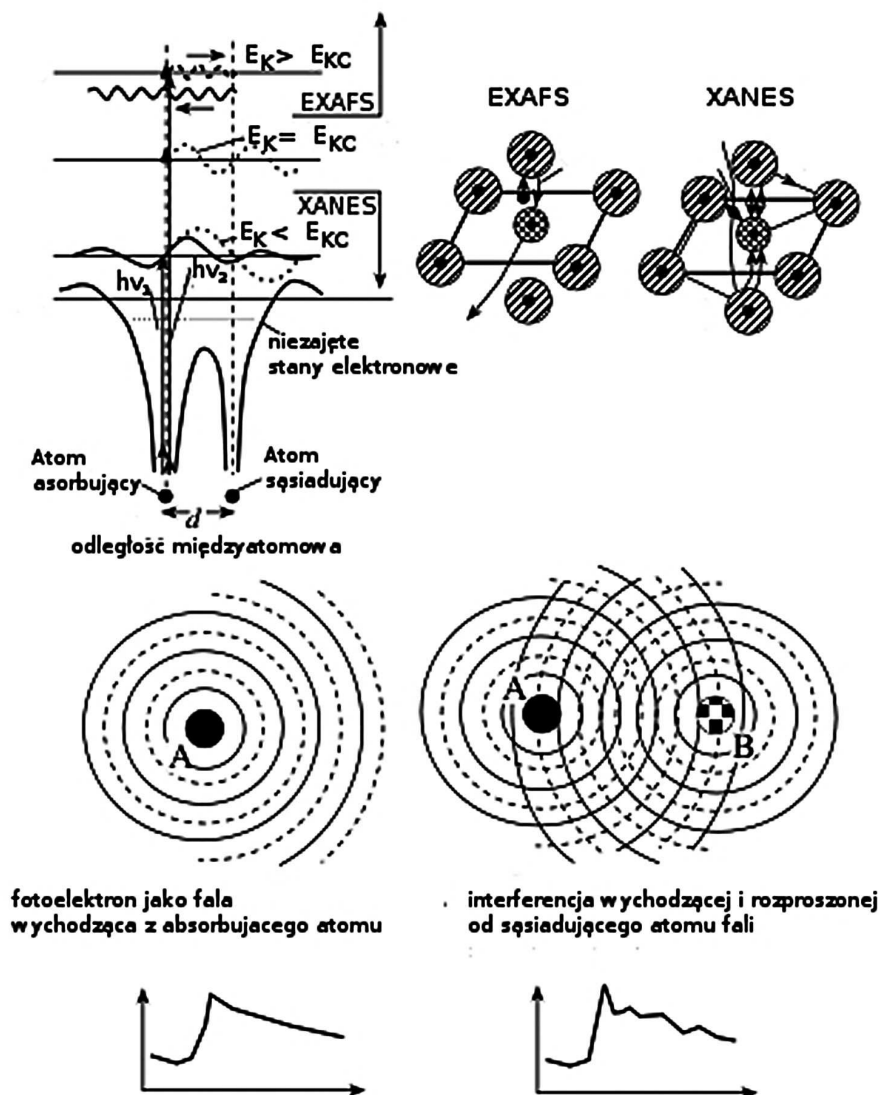
ten został wprowadzony ze względu na rodzaj informacji o materiale, jaki możemy uzyskać analizując odpowiedni zakres energetyczny widma. Rodzaj informacji zaś jest zależny od energii kinetycznej wytworzonego fotoelektronu. Na rys. 3.3 przedstawiono trzy rodzaje fotoelektronów. Pierwszy rodzaj to fotoelektrony o energii niewystarczającej do opuszczenia atomu, ale pozwalającej na to, aby nastąpiło przejście fotoelektronu do wolnego stanu walencyjnego stąd analiza XANES daje informacje o gęstości niezajętych stanów elektronowych absorbującego atomu. Fotoelektrony drugiego i trzeciego typu uzyskują po wzbudzeniu energie kinetyczne wystarczające na przeniesienie do stanu continuum. Jednakże fotoelektrony drugiego typu o niskiej energii kinetycznej mogą zostać zatrzymane w potencjale atomu przed całkowitym jego opuszczeniem i dają one wkład do widma z zakresu XANES. Natomiast trzeci typ fotoelektronów o energii wyższej od krytycznej E_C będzie ulegał wyraźnym rozproszeniom na sąsiadujących atomach, co przekłada się na pojawienie oscylacji widma XAFS w zakresie EXAFS. Analiza tego zakresu widma pozwala zatem na uzyskanie informacji o ilości sąsiadujących atomów, ich rodzaju i odległości do atomu absorbującego.



Rysunek 3.3. Trzy rodzaje przejść fotoelektronu w zależności od uzyskanej przy wzbudzeniu energii kinetycznej. Przejścia fotoelektronu wzbudzonego przez foton o energii $< E_C$ są rejestrowane w zakresie XANES, natomiast przejścia powstałe przy wzbudzeniu fotonem o energii większej niż E_C istnieją w zakresie EXAFS.

W interpretacji falowej fotoelektron jest traktowany jako fala materii, która ulega rozproszeniom na potencjałach sąsiadujących atomów do wzbudzonego atomu. Fala ta jest rozpraszana również przez sam atom wzbudzony. Dla niskich energii fotoelektronu czyli fal de Broglie o długości porównywalnej z odległością od atomu wzbudzonego do atomu rozpraszającego co koresponduje z obszarem XANES przeważają rozpraszania wielokrotne, [55]. Dla energii wysokich a tym samym krótkich fal de Broglie dominują rozpraszania pojedyncze, rys. 3.4.

Niewątpliwą zaletą metody XAFS jest jej selektywność ze względu na rodzaj atomu dzięki temu, że poziomy energetyczne dla poszczególnych atomów są zróżnicowane a przekaz energii od fotonu do związanego elektronu odbywa się tylko wtedy gdy energia fotonu jest wystarczająca na przeniesienie fotoelektronu do dostępnego wolnego stanu elektronowego. Rozkład niezajętych stanów elek-



Rysunek 3.4. Diagram obrazujący przejście fotoelektronu na różne poziomy energetyczne w zależności od uzyskanej energii kinetycznej E_K . Energia krytyczna E_{KC} , która stanowi granicę pomiędzy obszarem EXAFS i XANES wynosi $2\pi/d$ (d - odległość atomu rozpraszającego od absorbującego). Fotoelektron o energii z zakresu XANES ulega wielokrotnym rozproszeniom, natomiast w EXAFS przeważają rozproszenia jednokrotne. Dolna część rysunku obrazuje fotoelektron jako falę materii nierozproszoną w przypadku braku sąsiadujących do wzbudzonego atomów. W takim wypadku nie powstaje struktura oscylacyjna na widmie absorpcyjnym w zakresie EXAFS. Struktura oscylacyjna powstaje w przypadku gdy zachodzi interferencja fali materii fotoelektronu z jego falą rozproszoną na sąsiednim atomie. Widmo XAFS dla tej ostatniej sytuacji wykazuje wyraźną strukturę subtelną.

tronowych zależy od rodzaju wiązania jakie tworzy absorbujący atom z atomami go otaczającymi, a także od ich przestrzennego rozkładu. XANES pozwala na próbkowanie niezajętych stanów elektronowych, a co za tym idzie uzyskanie informacji o lokalnej symetrii wokół atomu absorbującego. Ponieważ oddziaływanie fali elektromagnetycznej z elektronem zależy od polaryzacji jej pola elektrycznego, oraz funkcji spinowej elektronu i wzbudzonego atomu. XANES daje również informacje o spinie. Natomiast analizując EXAFS uzyskuje się dane o rodzaju, liczbie i odległości od absorbera otaczających atomów.

3.1 Podstawy teoretyczne powstawania struktury subtelnej oraz przykrawędziowej w absorpcyjnej spektroskopii rentgenowskiej

Zamieszczony podrozdział został opracowany w oparciu o następujące prace: artykuły P.A. Lee i in. z 1975r. oraz J. Rehr'a i in. z 1991r., pracę doktorską M.G. Newville'a z 1995r. i artykuł B. Ravel'a z 2005r. [56, 57, 58, 59].

Mierzony eksperymentalnie współczynnik absorpcji $\mu(E = \hbar\omega)$ można przedstawić jako sumę współczynników absorpcji fotonu dla pojedynczych atomów:

$$\mu(\omega) = \sum_i n_i \sigma_i(\omega), \quad (3.1)$$

gdzie n_i oznacza liczbę atomów danego rodzaju w jednostce objętości, a σ jest przekrojem czynnym na zaabsorbowanie fotonu przez atom. Foton zostaje zaabsorbowany wtedy, kiedy niesie ze sobą odpowiednio wysoką energię, równą co najmniej energii wiązania elektronu na danej powłoce atomowej. Wystąpienie krawędzi absorpcyjnej, oraz struktury subtelnej w dalszej części rentgenowskiego widma absorpcyjnego XAFS jest uwarunkowane obecnością wolnego, dostępnego stanu elektronowego dla wyemitowanego wewnętrznego fotoelektronu po zaabsorbowaniu fotonu o odpowiedniej energii. Dla formalnego opisu rentgenowskiej absorpcji proces ten jest traktowany jako przejście układu pomiędzy dwoma stanami: początkowym z elektronem związanym, fotonem i bez obecności fotoelektronu, oraz końcowym z dziurą elektronową i bez fotonu, ale za to z wyemitowanym wewnętrznym fotoelektronem. Przekrój czynny na zaabsorbowanie fotonu przez atom wyznaczony jest zatem przez prawdopodobieństwo przejścia $\Gamma(\omega)$ układu ze stanu podstawowego do stanu wzbudzonego:

$$\sigma_i(\omega) = \frac{\Gamma(\omega)}{n_f c}, \quad (3.2)$$

gdzie n_f jest liczbą fotonów na jednostkową objętość w wiązce a c prędkością światła. Wykorzystując Złotą Regułę Fermiego [60] prawdopodobieństwo przejścia pomiędzy stanem początkowym a stanem końcowym można zapisać jako:

$$\Gamma = 2\pi/\hbar \sum_f \langle \Psi_i^N | \hat{H} | \Psi_f^N \rangle^2 \delta(E_f^N - E_i^N - \hbar\omega), \quad (3.3)$$

gdzie Ψ_i^N a Ψ_f^N to funkcje stanów elektronowych N elektronów odpowiednio początkowego i końcowego stanu układu a $\hat{H}$ to operator - hamiltonian oddziaływania fotonu z elektronem, który wyznacza się następująco:

$$\hat{H} = -\frac{e}{mc}\mathbf{A} \cdot \mathbf{p}, \mathbf{A} = \hat{\epsilon} \left(\frac{2\pi\hbar c^2 n_f}{\omega} \right)^{\frac{1}{2}} e^{i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}}, \quad (3.4)$$

gdzie e to ładunek elektronu, m - masa elektronu, $\mathbf{p}$ - wektor pędu elektronu $\mathbf{A}$ - wektorowy potencjał fotonowej fali elektromagnetycznej $\hat{\epsilon}$ - jednostkowy wektor polaryzacji fotonu $\mathbf{q}$ - wektor pędu fotonu $\mathbf{r}$ - położenie elektronu.

Funkcje stanu N elektronów można zastąpić przybliżeniem kombinacji funkcji stanów pojedynczych elektronów wykorzystując do tego celu formalizm Slatera [61]. W danym wypadku interesująca jest funkcja stanu elektronu, któremu została przekazana energia fotonu, oraz funkcja stanu pozostałych elektronów atomu. Funkcje stanu N elektronów można przedstawić jako:

$$|\Psi_j^N\rangle \cong |\Psi_j^{N-1}\rangle \otimes |\phi_j\rangle \quad (3.5)$$

gdzie $|\phi_j\rangle$ opisuje stan pojedynczego elektronu. W dalszym zapisie równań $|\phi_i\rangle$ będzie opisywać stan elektronu w atomie przed zaabsorbowaniem energii a $|\phi_f\rangle$ stan fotoelektronu. Element macierzowy w równaniu 3.3 przybiera postać:

$$\langle \Psi_i^N | \hat{H} | \Psi_f^N \rangle = \langle \phi_i | \mathbf{A} \cdot \mathbf{p} | \phi_f \rangle \langle \Psi_i^{N-1} | \Psi_f^{N-1} \rangle \quad (3.6)$$

Przy założeniu braku wzbudzeń wieloelektronowych danego atomu oraz braku efektu relaksacji przekrycie stanów elektronów niepodlegających bezpośredniemu wzbudzeniu przed i po absorpcji fotonu wynosi 1. Innymi słowy jest to założenie o braku zmiany stanu pozostałych elektronów w atomie podczas i po absorpcji fotonu. Przekształcając równanie 3.6 przez podstawienie wyrażenia na potencjał wektorowy $\mathbf{A}$ z równania 3.4 można uzyskać zmodyfikowany wzór na przekrój czynny oddziaływania atomu z fotonem:

$$\sigma(\omega) = \frac{4\pi^2 e^2}{\omega c m^2} \sum_f \langle \phi_i | e^{i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}} \hat{\epsilon} \cdot \mathbf{p} | \phi_f \rangle^2 \delta(E_f - E_i - \hbar\omega); \quad (3.7)$$

który jeśli zaniedbać wzbudzenia wieloelektrodowe jest wzorem dokładnym. Jednakże do wykorzystania go w obliczeniach należy zastosować pewne przybliżenia. Czynniki eksponenty w elemencie macierzowym równania 3.7 można zapisać następująco:

$$e^{i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}} = 1 + i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r} + \dots, \quad (3.8)$$

a w późniejszych przekształceniach równania 3.7 wykorzystywać tylko do wyrazu rozwinięcia, które jest wyrażeniem na elektryczny dipol. Prowadzi to do następującej formuły na przekrój czynny (równanie zapisano w przestrzeni wektora położenia ze względu na wykorzystany dalej formalizm funkcji Greena):

$$\sigma(\omega) = 4\pi^2 \alpha \hbar \omega \sum_f \langle \phi_i | \hat{\epsilon} \cdot \mathbf{r} | \phi_f \rangle^2 \delta(E_f - E_i - \hbar\omega) \quad (3.9)$$

Równanie można rozwiązywać dwoma sposobami. Pierwszy z nich polega na wyborze reprezentacji stanu podstawowego elektronu związanego i stanów fotoelektronu a następnie policzenia elementów macierzowych równania 3.9. Ten sposób jest często wykorzystywany w teorii molekularnych orbitali. Główna trudność polega na odpowiednim wyborze reprezentacji stanów końcowych fotoelektronu. Drugi sposób rozwiązania równania 3.9 związany z teorią wielokrotnego rozpraszania polega na zapisaniu go przy pomocy formalizmu funkcji Greena. Oba sposoby są równoważne, a różnią się wprowadzonymi przybliżeniami. Dla teorii XAFS wykorzystywany jest na ogół drugi z powyżej omówionych sposób, ponieważ pozwala łatwo wprowadzić matematyczny opis wielokrotnych rozprożeń fotoelektronu na sąsiednich atomach, jak również uproszczenie obliczeń. Postać operatora Greena używanego do zmiany zapisu równania 3.9 na przekrój czynny oddziaływania jest następująca:

$$\mathbf{G} = \frac{1}{E - H + i\zeta} = \frac{|\phi_f\rangle\langle\phi_f|}{E - H + i\zeta}, \quad (3.10)$$

gdzie $H = H_0 + V$ jest jednoelektronowym Hamiltonianem, V - potencjałem pochodzącym od jonów i atomów materiału, czyli potencjałem zewnętrznym, E - energią fotonu, a ζ pozytywną nieskonczonie małą wartością energii zapewniającą analityczność funkcji Greena. Przekrój czynny po przekształceniu równania 3.9 wyraża się przez:

$$\sigma(\omega) = -4\pi^2 \alpha \hbar \omega \text{Im} \langle \phi_i | \hat{\epsilon}^* \mathbf{r} \cdot \mathbf{G}(E) \hat{\epsilon} \mathbf{r} | \phi_f \rangle \Theta(E_f - E_F) \quad (3.11)$$

Θ jest funkcją Heaviside, która powoduje, że przekrój czynny jest niezerowy tylko dla energii powyżej poziomu Fermiego E_F . Operator Greena $\mathbf{G}$ jest jednoelektronowym propagatorem w obecności rozpraszającego potencjału V i podlega samouzgodnionemu równaniu Dysona na funkcje Greena dla Hamiltonianu:

$$\mathbf{G} = \mathbf{G}^0 + \mathbf{G}^0 V \mathbf{G}; \quad (3.12)$$

gdzie $\mathbf{G}^0 = \frac{1}{E - H_0 + i\zeta}$ jest propagatorem Greena cząstki swobodnej. Obok operatora Greena wprowadzony jest pomocniczy operator rozpraszania $\mathbf{T}$,

$$\mathbf{T} \equiv V + V \mathbf{G} V, \quad (3.13)$$

mający te same analityczne właściwości co operator Greena $\mathbf{G}$. Operator rozpraszania $\mathbf{T}$ można wyrazić przy pomocy tzw. operatorów single-site $\mathbf{t}$, dotyczących rozprożeń na pojedynczym centrum (atomie bądź jonie w materii):

$$\mathbf{T} = \mathbf{t} + \mathbf{t}\mathbf{G}^0\mathbf{t} + \mathbf{t}\mathbf{G}^0\mathbf{t}\mathbf{G}^0\mathbf{t} + \dots \quad (3.14)$$

Przy pomocy równania 3.14 można rozwiązać samouzgodnione równanie Dysona 3.12 w następujący sposób:

$$\mathbf{G} = \mathbf{G}^0 + \mathbf{G}^0\mathbf{t}\mathbf{G}^0 + \mathbf{G}^0\mathbf{t}\mathbf{G}^0\mathbf{t}\mathbf{G}^0 + \dots \quad (3.15)$$

$$\mathbf{G} = (1 - \mathbf{G}^0\mathbf{t})^{-1} \mathbf{G}^0 \quad (3.16)$$

Każdy z wprowadzonych powyżej operatorów: $\mathbf{G}$, $\mathbf{G}^0$ i $\mathbf{t}$ ma fizyczna interpretację [62]. Jeśli fotoelektron jest rozpatrywany jako fala materii rozchodząca się sferycznie z atomu, w którym zaszła absorpcja fotonu to $\mathbf{G}$ opisuje wszystkie możliwe drogi rozproszenia fotoelektronu na jednym, bądź więcej atomach w czasie, w którym absorbujący atom pozostaje w stanie wzbudzonym. $\mathbf{G}^0$ opisuje propagację fotoelektronu pomiędzy dwoma punktami przestrzeni a $\mathbf{t}$ rozproszenie fotoelektronu od pojedynczego atomu. Równanie 3.15 przedstawia zapis dla pojedynczych i kolejnych wielokrotnych rozproszeń. I tak wyraz $\mathbf{G}^0\mathbf{t}\mathbf{G}^0$ opisuje wszystkie możliwe drogi w których fotoelektron jest rozpraszany na jednym i tylko jednym sąsiadującym atomie, natomiast wyraz $\mathbf{G}^0\mathbf{t}\mathbf{G}^0\mathbf{t}\mathbf{G}^0$ opisuje wszystkie możliwe drogi rozpraszania na dokładnie dwóch atomach i tak dalej. Teoretyczne widmo XANES jest liczone na podstawie równań 3.11 i 3.16. Natomiast teoretyczne widmo EXAFS na podstawie 3.11 i 3.15. Funkcja EXAFS jest zdefiniowana jako:

$$\chi = \frac{\mu - \mu_0}{\Delta\mu_0} = \frac{\sigma - \sigma^0}{\Delta\sigma^0}, \quad (3.17)$$

gdzie μ_0 i σ^0 dotyczą odpowiednio współczynnika absorpcji i przekroju czynnego na zaabsorbowanie fotonu dla atomu bez uwzględnienia rozproszeń od atomów sąsiadujących a $\Delta\mu_0$ jest zmianą we współczynniku absorpcji na krawędzi. Wprowadzając do tej definicji wyprowadzone wcześniej wyrażenie na przekrój czynny z równania 3.11 i po uwzględnieniu pewnych poprawek, takich jak: przybliżenie fali fotoelektronu w pobliżu atomu rozpraszającego przez falę płaską, skończony czas życia stanu wzbudzonego atomu, określoną długość drogi swobodnej fotoelektronu na skutek rozproszeń nieelastycznych czy wieloelektronowe wzbudzenia otrzymuje się następujące równanie na teoretyczną funkcję EXAFS:

$$\chi(k) = \sum_j \frac{N_j S_0^2 F_j^{eff}(k)}{(kr_j)^2} \sin \left(2ikr_j + \phi_j^{eff}(k) \right) e^{2k^2\sigma_j^2} e^{-2r_j/\lambda(k)}, \quad (3.18)$$

gdzie sumowanie wykonane jest po wszystkich możliwych drogach rozpraszania uwzględniając również rozpraszania wielokrotne. Nie jest to dokładnie takie

równanie jakim posługiwano się w analizie widm EXAFS (patrz opis EXCURVE), ale zostało tu umieszczone ze względu na łatwość jego interpretacji i jasny opis idei wykorzystywanej metody. Opisuje ono interferencje fali wyemitowanego fotoelektronu z falą rozproszoną przez potencjały atomów sąsiadujących i przez potencjał atomu emitującego. Dla rozproszeń wielokrotnych r_j jest połową wartości długości sumy odległości pomiędzy kolejnymi atomami rozpraszającymi. Dla rozpraszania pojedynczego r_j jest długością wiązania, bądź też odległością atomu rozpraszającego do emitującego fotoelektron. N_j określa liczbę atomów danego rodzaju w danym położeniu. F_j^{eff} jest dla rozproszeń pojedynczych amplitudą rozproszenia na jednym rozpraszającym atomie a dla rozproszeń wielokrotnych efektywną amplitudą rozproszenia od więcej niż jednego rozpraszającego centrum z uwzględnieniem wzajemnych położzeń rozpraszających atomów. ϕ_j^{eff} określa przesunięcie fazowe rozproszonej fali fotoelektronu na określonym atomie a w przypadku rozproszeń wielokrotnych jest efektywnym przesunięciem fazowym w rozproszonej fali fotoelektronu powstałym z rozproszenia na więcej niż jednym atomie. S_0^2 odpowiada za procesy wieloelektronowe we wzbudzonym atomie w szczególności za proces relaksacji w atomie po wyemitowaniu fotoelektronu. W założeniu braku zmiany funkcji falowej elektronów po wzbudzeniu atomu wartość S_0^2 wynosi 1. W założeniu takiej zmiany funkcje falowe nie przekrywają się i wartość S_0^2 jest mniejsza od 1. W równaniu EXAFS występują dwa wyrażenia eksponentialne odpowiedzialne za redukcję amplitudy. Jest to funkcja eksponentialna zawierająca średnią drogę swobodną fotoelektronu $\lambda(k)$. Fotoelektron ma ograniczony czas życia ze względu na przekaz energii w procesach nieelastycznych stąd EXAFS próbkuje tylko lokalne otoczenie w sferze mniejszej na ogół od 6 Å. Kolejna funkcja eksponentialna to funkcja zawierająca wariancję σ_j^2 Gaussowskiego rozkładu odległości danego atomu, bądź sumy odległości atomów. Wkład do σ_j^2 wnoszą zarówno nieuporządkowanie strukturalne jak również nieuporządkowanie ze względu na termiczne ruchy atomów. Podwojona wartość warjancji: $2\sigma_j^2$ będzie w dalszej części pracy uznawana za wartość czynnika Debya-Wallera. W analizie EXAFS widma danego materiału teoretyczna funkcja $\chi(k)$ jest dopasowywana przez parametryzację wartości r_j , σ_j^2 , oraz N_j .

3.2 Zastosowane metody i programy

3.2.1 Program EXCURVE

Program EXCURVE służy do obliczania teoretycznej funkcji EXAFS i dopasowania jej do unormowanej oscylacyjnej części eksperymentalnego widma. Oznacza to wyznaczenie z określonym błędem odległości od atomu absorbującego i czynników Deby'a-Wallera dla atomów w najbliższym jego otoczeniu. Potrzebne dane wejściowe do rozpoczęcia procedury dopasowania to poza eksperymentalną funkcją EXAFS model proponowanej struktury badanego materiału, oraz parametry określające sposób dopasowania funkcji. Jako model strukturalny służy grupa lub kilka grup atomów. Każda z grup powinna zawierać absorbujący atom, którego dotyczy widmo EXAFS. W niniejszej rozprawie brano pod uwagę modele tylko z jednym rodzajem potencjalnego otoczenia absorbera (dla

różnych modeli struktura otoczenia może i na ogół jest różna), dlatego posłużono się jedną grupą atomów dla pojedynczego modelu. Ta grupa zwana jest dalej klastrem. Położenia atomów w klastrze muszą zostać jednoznacznie określone przez współrzędne radialne lub kartezjańskie. Przy czym, w analizie biorącej pod uwagę jedynie rozproszenia jednokrotne na pojedynczych atomach nie są istotne wzajemne położenia atomów. Natomiast w przypadku uwzględnienia w analizie rozproszeń wielokrotnych wymagane jest także określenie grupy punktowej według której ułożone są atomy w klastrze. Wykonane w pracy przy pomocy programu EXCURVE obliczenia teoretycznej funkcji EXAFS były oparte na metodzie “fast spherical wave” zarówno we wstępnej analizie dla rozproszeń na pojedynczych atomach [63] jak również pełnej analizie przy uwzględnieniu rozproszeń wielokrotnych [56, 62, 64, 65]. Metoda ta nie stosuje przybliżenia fali płaskiej dla fotoelektronu tj. nie zakłada nieskończenia małych wymiarów atomu rozpraszającego w stosunku do zakrzywienia fali fotoelektronu.

Metoda “fast spherical wave” powstała w oparciu o następująco zapisane równanie na funkcje EXAFS [63]:

$$\chi(E) = \frac{\sum_{m_0} \sum_{LM, l' m'} \langle l_0 m_0 | \hat{\epsilon} \cdot \mathbf{r} | LM \rangle e^{i\delta_L} 2 \operatorname{Re} Z_{LM, l' m'} e^{i\delta_{l'}} \langle l' m' | \hat{\epsilon} \cdot \mathbf{r} | l_0 m_0 \rangle}{\sum_{m_0} \sum_{lm} |\langle lm | \hat{\epsilon} \cdot \mathbf{r} | l_0 m_0 \rangle|^2}, \quad (3.19)$$

gdzie liczby kwantowe $l_0 m_0$ określają funkcję falową elektronu w stanie podstawowym przed wzbudzeniem, lm i $l' m'$ określają funkcje falowa fotoelektronu wzbudzonego w przypadku odpowiednio fotoelektronu pochodzącego z wyizolowanego i otoczonego innymi atomami atomu absorbującego a LM to liczby kwantowe określające stan fotoelektronu po rozproszeniu na otaczających absorber atomach. Efekty rozproszenia takie jak zmiana amplitudy rozproszonej fali fotoelektronu są zawarte w macierzy Z , natomiast zmiana fazy fali fotoelektronu w czynniku $e^{i\delta_L}$ - fala wracająca i $e^{i\delta_{l'}}$ - fala wychodząca. Pracy P.A. Lee oraz J.B. Pendry zawiera dokładny opis wyznaczenia macierzy Z [56]. Dla materiałów polikrystalicznych (porfiryne materiały proszkowe) bądź amorficznych (roztwory porfiryne materiały proszkowych), gdzie orientacja atomów w materiale w stosunku do padającej wiązki fotonów jest przypadkowa kierunek wektora polaryzacji jest uśredniany i po odpowiednich przekształceniach równanie 3.19 przyjmuje postać:

$$\chi(E) = \frac{2}{2L+1} \operatorname{Re} \sum_M Z_{LM, LM} e^{2i\delta_L}, \quad (3.20)$$

gdzie zgodnie z regułami wyboru $L=l_0 \pm 1$ Policzenie funkcji $\chi(E)$ sprowadza się zatem do policzenia sumy diagonalnych elementów macierzy Z . Macierz Z może zostać zapisana jako suma macierzy zawierających wkład od rozproszeń na

pojedynczych atomach Z^1 , wkład od rozproszeń na dwóch atomach Z^2 , wkład od rozproszeń na trzech atomach Z^3 itd.:

$$Z = Z^1 + Z^2 + Z^3 + \dots + Z^n, \quad (3.21)$$

Wzory na liczone *explicite* przez EXCURVE sumy diagonalnych elementów macierzy Z^i zawiera praca opublikowana przez autorów: S.J. Gurman, N. Binsted i I. Ross [64]. Poniżej przytoczono wzór na taką sumę liczoną dla macierzy Z^1 :

$$\sum_M Z_{LM,LM}^1 = \sum_{L_1 L_2} \left(h_{L_1}^{(1)}(kR) \right)^2 \mathbf{T}_{L_2}(2L+1)(2L_1+1)(2L_2+1) [C(LL_1 L_2; 000)]^2, \quad (3.22)$$

gdzie $\mathbf{T}_{LM,l'm'} = \frac{1}{2} (e^{2i\delta_L} - 1) \delta_{Ll'} \delta_{Mm'}$, jest macierzą rozpraszania diagonalną dla sferycznie symetrycznego potencjału rozpraszającego, h - funkcja Hankela a $C(L L_1 L_2; 0 0 0)$ współczynnikiem Clebsch-Gordan niezależnym od energii i parametrów strukturalnych. Nieuporządkowanie strukturalne, bądź spowodowane przez ruchy termiczne atomów wokół ustalonej odległości R_0 od atomu absorbującego jest wyrażone przez funkcje $g(R)$ i uwzględnione w wyrazach macierzy Z przez:

$$Z(kR) = \int Z(kR_0)g(R)dr \quad (3.23)$$

W przypadku analizowanych danych nieuporządkowanie wyrażone było przez funkcję gaussowską. Potencjał w jakim porusza się fotoelektron został założony przez tak zwany potencjał muffin-tin, gdzie potencjał wokół poszczególnych atomów jest sferycznie symetryczny oraz płaski w przestrzeni międzyatomowej. Tak założony potencjał jest następnie korygowany przez “complex Hedin-Lundqvist exchange and correlation” potencjał, który odpowiada za imitację i modelowanie procesów nieelastycznych w materiale, takich jak skończony czas życia stanu wzbudzonego i fotoelektronu w wyniku nieelastycznego rozproszenia czy wielokrotnych wzbudzeń elektronowych w atomie absorbującym. Poniżej opisano parametry statystyczne decydujące o jakości dopasowania.

Jakość dopasowania R , którą definiujemy poniższym równaniem:

$$R = \left[\int |X^T - X^E| k^n dk / \int |X^E| k^n dk \right] \times 100\%$$

stanowi scałkowaną po przestrzeni wektora falowego k absolutną różnicę eksperymentalnej X^E i teoretycznej X^T funkcji EXAFS podzieloną przez scałkowane po tej samej przestrzeni eksperymentalne widmo. Wartość podcałkowa zarówno licznika jak i mianownika jest mnożona przez k^n , gdzie n stanowi liczbę naturalną - najczęściej 2 lub 3 - i jest wybierane przez analizującego do zwiększenia wagi oscylacji dla wyższych wartości wektora falowego. Parametr R jest oceną jakości przeprowadzonego dopasowania.

Definicję kolejnego parametru - z ang. Fit-indeks - FI - wskazującego jak blisko doświadczalnej funkcji oscylacyjnej jest określona, teoretyczna funkcja EXAFS przedstawia następujące równanie:

$$FI = \sum [(X_i^T - X_i^E) k_i^n]^2$$

Jest to suma kwadratów pomnożonej przez wielokrotność wartości wektora falowego różnicy wartości eksperymentalnej i teoretycznej funkcji EXAFS dla każdego mierzonego punktu eksperymentalnego widma. Wartość czynnika zależy od przyjętego parametru n dlatego można go porównać jedynie dla funkcji EXAFS o oscylacjach traktowanych z taką samą wagą przy dopasowaniu. Wartość ta zależy również od poziomu zaszumienia sygnału. Przyjmuje się, że z dopasowań dla których wartość R jest podobna bardziej wiarygodne jest to, dla którego parametr FI jest mniejszy. Wartość parametru FI, a przede wszystkim jego zmiany są ważne w trakcie przeprowadzania procedury dopasowania. Kolejny, absolutny parametr jakości dopasowania, który jest dany przez zredukowaną funkcję χ^2 , dla funkcji EXAFS przedstawia się następująco [66]:

$$\varepsilon_v^2 = 1 / (N_{ind} - p) (N_{ind} / N) \sum w_i (X_i^{exp}(k) - X_i^{th}(k))^2$$

gdzie N_{ind} jest liczbą niezależnych punktów pomiarowych a p liczbą parametrów dopasowania. N_{ind} niezależnych punktów pomiarowych jest mniejsza od liczby wszystkich punktów pomiarowych i w wypadku , gdy dopasowywana funkcja EXAFS w przestrzeni k z zakresu k_{min} do k_{max} jest odwrotnie transformowana (transformacja Fouriera) przy użyciu okna r_{min} do r_{max} za liczbę niezależnych parametrów przyjmuje się:

$$N_i = \frac{2}{\pi} (r_{max} - r_{min}) (k_{max} - k_{min})$$

Dwa pierwsze parametry: R i FI są przedstawianymi wyznacznikami jakości dopasowania dla widm w niniejszej pracy.

3.2.2 Program FEFF

Z programu FEFF [67, 68] korzystano przy obliczaniu teoretycznego widma XANES na podstawie strukturalnych modeli uzyskanych przez dopasowanie widm EXAFS. FEFF wykorzystuje formalizm funkcji Greena i policzenie funkcji XANES sprowadza się do policzenia wyrażenia 3.16. Metoda nazywana jest Full Multiple Scattering (FMS). Rozmiar macierzy jest zdeterminowany przez liczbę atomów w otoczeniu absorbera branych pod uwagę podczas analizy. FEFF zakłada potencjał typu muffin tin i wprowadza algorytm odpowiedniego dostosowania promieni stref symetrycznego potencjału wokół rozpraszających atomów i odpowiedniego nałożenia potencjałów pochodzących od różnych atomów (self consistent potentials) [69]. Potencjał ten był następnie korygowany przez potencjał Hedin-Lundqvist/Quinn. Zakres obliczanego widma XANES obejmował również energie niższe od energii głównej krawędzi absorpcji, co pozwalało na obliczenie miejsca występowania i amplitudy struktur odpowiedzialnych za przejście 1s do stanów 3d i shybrydyzowanych stanów p z d. Program FEFF nie posiada opcji dopasowywania liczonego widma XANES do widma eksperymentalnego, stąd brak parametrów jakości dopasowania, a zgodność ze strukturalnym modelem EXAFS potwierdzano jedynie na podstawie podobieństwa kształtów funkcji XANES policzonej i zmierzonej.

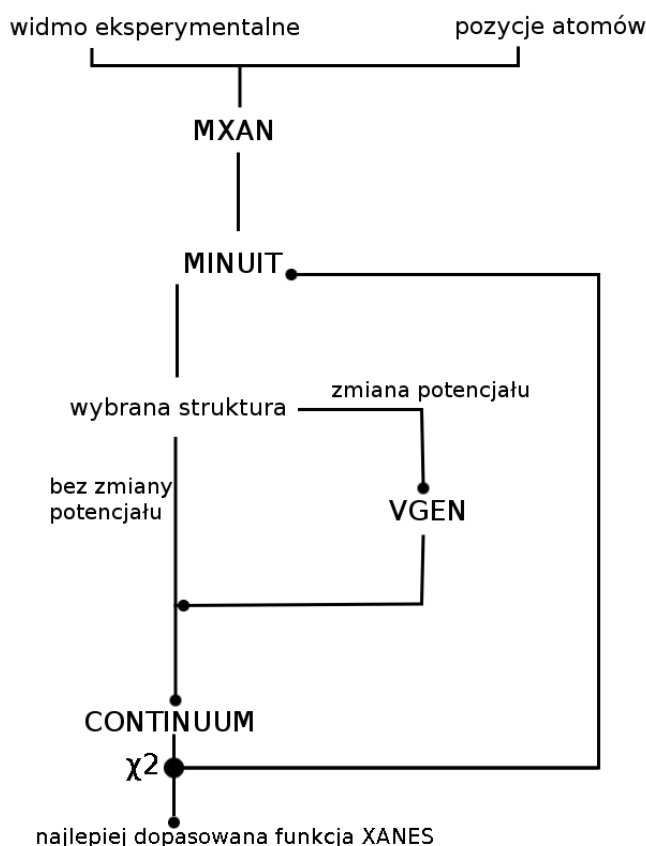
3.2.3 Program MXAN

Program MXAN [70] wykorzystano do obliczeń, oraz optymalizacji przestrzennych pozycji atomów w wejściowym strukturalnym modelu otrzymanym przy dopasowaniu EXAFS tak by teoretyczne widmo XANES jak najlepiej odpowiadało eksperymentalnemu. Schemat działania programu przedstawia rys. 3.5.

Program MXAN wykorzystuje program CONTINUUM [71] do policzenia przekroju czynnego oddziaływania fotonu z elektronem wewnętrznej powłoki i, podobnie jak FEFF, oblicza wyrażenie 3.16 z potencjałem muffin-tin [71, 72, 73] obliczanym przez program VGEN. Promień sferycznego potencjału jest wybierany na podstawie kryterium Normana [74]. Potencjał korygujący odpowiedzialny za procesy nieelastyczne jest opcjonalny i na potrzeby tej pracy został przyjęty jako complex Hedin-Lundqvist [75]. Obliczenia są przez MXAN wykonywane w przestrzeni energii bez użycia algorytmów transformaty Fouriera. Obliczona teoretycznie funkcja XANES jest następnie splatana z funkcją Lorentza po to, by uwzględnić poszerzenie ze względu na czas życia stanu wzbudzonego dla absorbującego atomu (jeśli nie zostało to uwzględnione w potencjale korygującym), oraz rozdzielczość eksperymentalną. Kod MINUIT zmienia pozycje atomów w określonym przestrzennym zakresie współrzędnych tak by minimalizować funkcję S^2 określającą jakość dopasowania:

$$S^2 = N \frac{\sum_{i=1}^n w_i [(y_i^{th} - y_i^{exp}) \varepsilon_i^{-1}]^2}{\sum_{i=1}^n w_i}, \quad (3.24)$$

gdzie N jest liczba niezależnych parametrów, n liczba punktów eksperymentalnego widma, y_i^{th} i y_i^{exp} wartościami odpowiednio teoretycznego i eksperymentalnego



Rysunek 3.5. MXAN - schemat obliczania i dopasowywania teoretycznej funkcji XANES do widma XANES mierzonego eksperymentalnie.

nego XANES, ε_i indywidualnym błędem określenia wartości w eksperymentalnym widmie a w_i statystyczną wagą punktu. W analizie danych, której wyniki przedstawiono w niniejszej rozprawie, przyjęto wartość ε_i taką samą dla każdego punktu danego widma, oraz wagę $w_i=1$.

3.2.4 Porównanie programów EXCURVE FEFF i MXAN w zastosowaniu do EXAFS i XANES

Wszystkie stosowane do analizy rentgenowskich widm absorpcyjnych programy korzystały z podobnych modeli teoretycznych opisujących potencjał wewnątrz materiału jako typu muffin-tin korygowany przez potencjał Hedin-Lunqvist. W ogólności programy EXCURVE FEFF i MXAN mogą wykorzystywać inny potencjał korygujący. Potencjał Hedin-Lunqvist został wybrany, ponieważ uzyskano dla niego najlepsze parametry dopasowania widm programami EXCURVE i MXAN. Dla przedstawionych wyników w niniejszej rozprawie wykorzystano opis fotoelektronu jako fali sferycznej, zarówno w analizie EXAFS, używając programu EXCURVE, jak i XANES, używając FEFF i MXAN. Było to bardzo istotne przy obliczaniu struktury widma w zakresie XANES i pozwalało na lepsze dopasowanie EXAFS w przypadku materiałów złożonych z pierwiastków lekkich. Tylko w programie EXCURVE możliwe jest potraktowanie fotoelektronu w procesie rozpro-

szenia jako fali płaskiej, ale wykorzystano to jedynie w początkowej fazie analizy. Programy FEFF i MXAN różnią się procedurą ustalania promieni stref sferycznego potencjału wokół atomów dla potencjału muffin-tin. Program MXAN uwzględnia kryterium Normana, [74], natomiast FEFF wykorzystuje metodę potencjałów samouzgodnionych (self consistent potentials) [69]. Programy FEFF i MXAN wprowadzają poszerzenie w widmie XANES ze względu na czas życia stanu wzbudzonego atomu, co jest uwzględnione w potencjale korygującym. MXAN oferuje dodatkowo możliwość uwzględnienia czasu życia stanu wzbudzonego absorbującego atomu w splatanej z XANES funkcji Lorentza. Wykorzystanie funkcji Lorentza przez MXAN pozwala na wprowadzenie jako jednego z czynników wpływających na XANES rozdzielczości eksperymentalnej. Zarówno EXCURV jak i MXAN pozwalają na modyfikacje położeń atomów w strukturze materiału. Podstawą ustalenia struktury cząsteczkowej materiałów badanych w niniejszej pracy były obliczenia i dopasowania EXAFS wykonane przy pomocy EXCURV. Dopiero na podstawie tych modeli były liczone (FEFF, MXAN) i dopasowywane (MXAN) widma XANES. Podczas obliczania teoretycznego widma XANES zauważono, że zmiana w strukturze wybranego atomu z lekkiego na ciężki jest znacznie bardziej widoczna w XANES liczonych przez MXAN niż FEFF. Być może, ma to związek z inną procedurą ustalania promieni stref sferycznego potencjału muffin-tin w obydwu programach. Kod MXAN poprzez parametr jakości dopasowania ma możliwość określenia w jakim stopniu prawdopodobny jest proponowany model, dlatego znalazł większe zastosowanie w rozwiązaniu postawionych w rozprawie problemów niż FEFF. Na potrzeby niniejszej rozprawy parametry nieuporządkowania strukturalnego były uwzględniane jedynie przez EXCURVE, ponieważ mają istotny wpływ w wysokoenergetycznej części widma - EXAFS. W obydwu programach liczących teoretyczną funkcję XANES - FEFF, MXAN, brak możliwości wprowadzenia ułamkowej liczby koordynacyjnej w klastrze dla materiału o niskiej symetrii.

Rozdział 4

Analiza danych

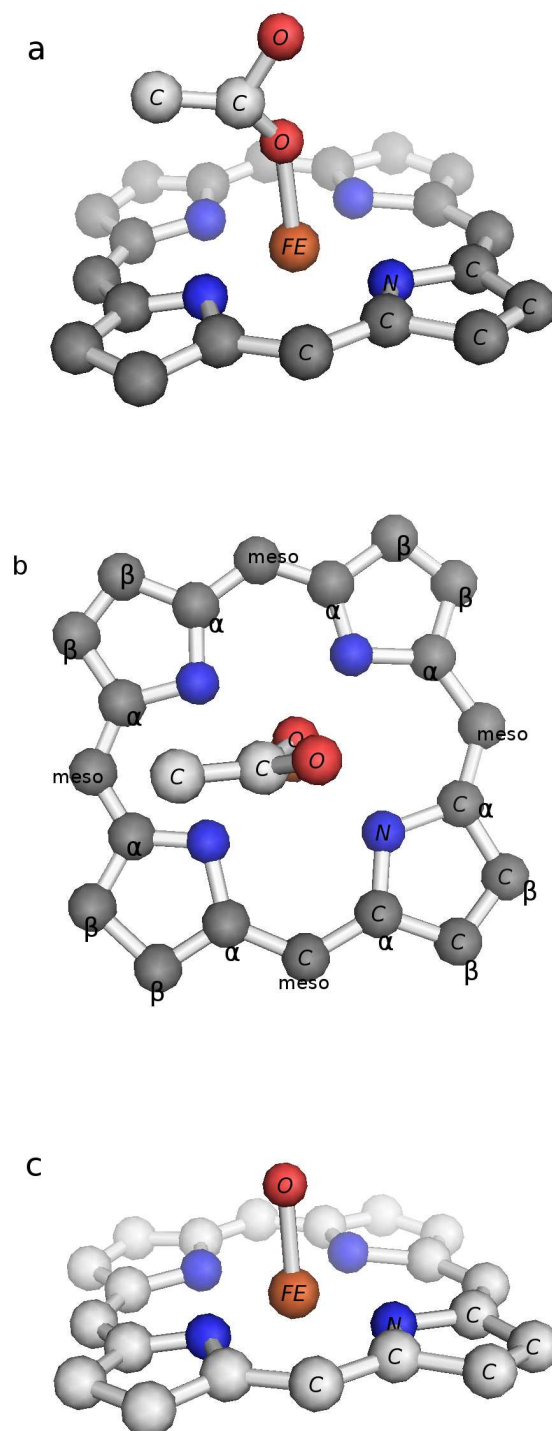
Abstrakt

W rozdziale omówiono przyjęte modele strukturalne i strategie ich modyfikacji dla otoczenia absorbującego atomu żelaza, zarówno dla badanych proszków, jak i roztworów: bez i z zawartością chlorochininy. Podano sposób dopasowania parametrów odległości i nieuporządkowania strukturalnego dla atomów i ich grup dla poszczególnych modeli. Pokazano graficznie jak ważne dla policzenia teoretycznej funkcji EXAFS jest uwzględnienie wielokrotnych rozproszeń w strukturze pierścienia protoporfiryny. Rozpatrzono wkład do teoretycznej funkcji $\chi(k)$ rozproszeń wielokrotnych ze względu na liczbę rozpraszających atomów, pod kątem zasadności włączenia do dopasowywanego modelu części atomów należących do struktury tlenowego wiązania mostkowego.

4.1 Strategie przyjęte do analizy EXAFS związków na bazie protoporfiryny IX

Podstawową jednostką strukturalną wykorzystywaną do tworzenia teoretycznego widma EXAFS, jak również jego dopasowania do eksperymentalnego widma jest trzon cząsteczki FePPIX złożony z jednego atomu żelaza, czterech atomów azotu i dwudziestu atomów węgla, oraz, dla związków o cząsteczce dimerowej, dwa atomy tlenu i dwa atomy węgla, rys. 4.1(a)(b), a dla związków o cząsteczce niedimerowej jeden atom tlenu, rys. 4.1(c) lub jeden atom chloru albo bromu. Taka jednostka w przypadku proszkowych związków mikrokrystalicznych stanowi klastery. W przypadku roztworów klastrem jest opisana wyżej jednostka strukturalna z dodatkowymi atomami, np. cząsteczki chlorochininy lub cząsteczki rozpuszczalnika.

Z założenia w procesie dopasowania żaden z atomów lub grup atomów charakterystycznych dla użytej jednostki strukturalnej nie były usunięte, jeżeli nie zostało to wyraźnie zaznaczone. W pierścieniu FePPIX pewne atomy możemy pogrupować ze względu na rodzaj i odległość od atomu absorbującego, a następnie stosować do atomów w jednej grupie takie same parametry, jak jednakowa odległość, lub jednakowa zmiana odległości od atomu absorbującego, czy też ten sam współczynnik Debya-Wallera. Symetria pierścienia porfirynowego pozwoliła na wprowadzenie



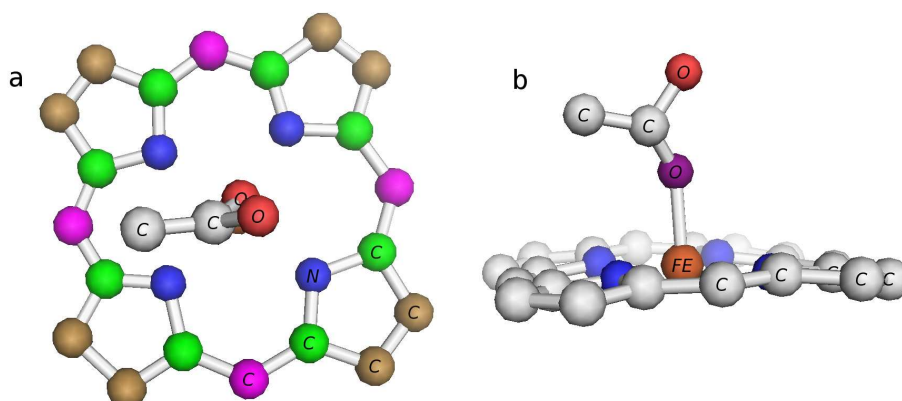
Rysunek 4.1. Jednostka strukturalna stanowiąca model do obliczeń teoretycznych i dopasowań dla cząsteczek dimerowych (a)(b), oraz dla cząsteczek złożonych z pojedynczej FePPIX (c). W jednostce strukturalnej cząsteczek złożonych z pojedynczej FePPIX znajdujący się poza płaszczyzną FePPIX atom tlenu może być zastąpiony atomem chloru lub atomem bromu. Oznaczono atomy węgla pierścienia FePPIX należące do grup C_α , C_{meso} i C_β (b). Dla pierścienia FePPIX jednostki strukturalnej monomerów oznaczenia węgli pozostają takie same.

tego typu metody dopasowania teoretycznych funkcji EXAFS do widma eksperymentalnego. Taka procedura umożliwiła zmniejszenie liczby skorelowanych parametrów w procesie dopasowania. W kolejnych etapach analizy widm przyjęto pewne strategie dopasowania parametrów poszczególnych atomów lub grup atomów.

4.1.1 Materiały proszkowe

Przyjęto pięć podstawowych strategii w analizie materiałów proszkowych. Zwykle stosowane były jedna po drugiej i w kolejnej wykorzystywano jako model wejściowy strukturę określoną przez strategię poprzednią, ze względu na zwiększającą się liczbę parametrów dopasowania, ale nie było to regułą. Strategie w zależności od strukturalnego modelu podlegały pewnym modyfikacjom.

Rozróżnienie pomiędzy pięcioma etapami dopasowania dla proszkowych materiałów mikrokryształicznych zostało wprowadzone, przede wszystkim, dla zbadania wpływu zmiany określonych parametrów na dopasowywana funkcje $\chi(k)$. Pozwoliło to na wypracowanie optymalnej strategii dopasowania widm EXAFS dla tego typu związków, jak również ich roztworów.

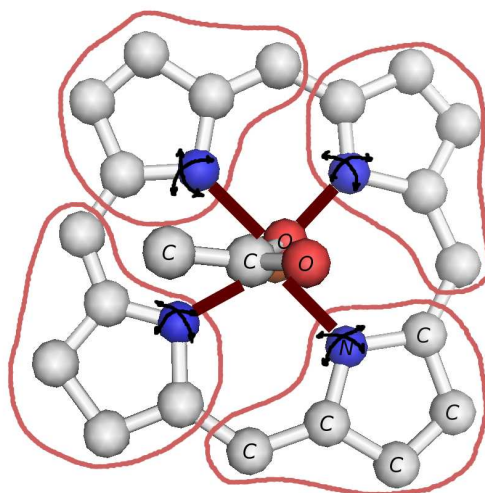


Rysunek 4.2. Strategia dopasowania pierwsza. Atomy podzielono na następujące grupy, których parametry dopasowywano: grupa czterech atomów azotu - oznaczona na niebiesko, grupa ośmiu atomów węgla typu (C_α) - kolor zielony, grupa czterech atomów węgla (C_{meso}) - kolor różowy, oraz grupa ośmiu atomów węgla (C_β) - kolor brązowy. Pozapłaszczyznowy atom tlenu najbliższy do centralnego atomu żelaza, zaznaczony kolorem fioletowym (b), sam jeden stanowi w tej strategii grupę. Pozostałe pozapłaszczyznowe atomy w trakcie procedury dopasowania nie zmieniały swoich pozycji.

Strategia pierwsza, rys. 4.2(a)(b) polegała na dopasowaniu jednakowych odległości od atomu absorbującego Fe i jednakowych współczynników Debye-Wallera dla atomów z następujących grup: grupa czterech atomów azotu (na rysunku oznaczonych na niebiesko), grupa ośmiu atomów węgla (C_α , na rysunku oznaczonych na zielono), grupa czterech atomów węgla (C_{meso} , na rysunku oznaczonych kolorem różowym), oraz grupa ośmiu atomów węgla (C_β na rysunku oznaczonych kolorem brązowym). Dopasowywano także parametry dla pozapłaszczyznowego

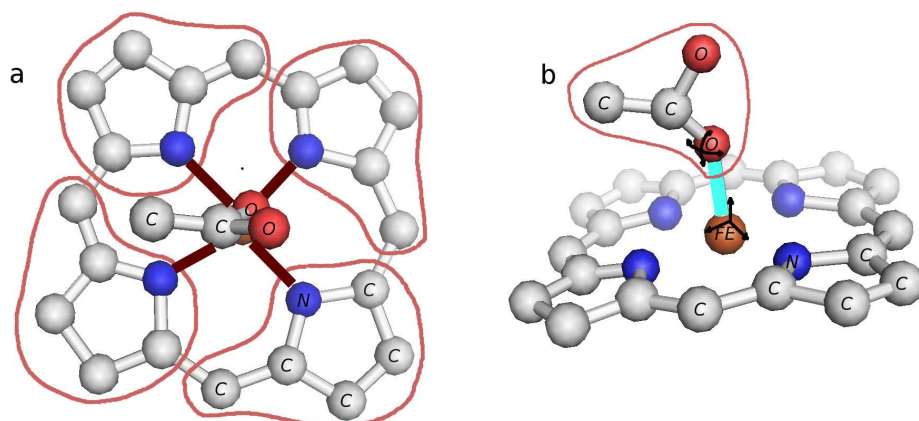
atomu tlenu oznaczonego na rys. 4.2(b) kolorem fioletowym. Atomy poruszały się niezależnie od siebie, ale w obszarze pierścienia FePPIX były na nie nałożone pewne więzy tak, by przyjęte położenia nie odbiegały od położen znajdujących w literaturze w tego typu związkach. Atomy pozapierścieniowe oprócz osiowego tlenu (dwa atomy węgla i atom tlenu, rys. 4.2(b)), których odległości nie były dopasowywane pozostają w pozycjach określonych przez badania krystalograficzne i ze względu na mniejszy wkład zostały włączone do procedury dopasowania w kolejnych krokach.

Strategia druga polegała na zmianie pozycji atomów w tzw. płaszczyźnie pierścienia FePPIX. Określenie to jest nie do końca ścisłe, gdyż atomy pierścienia porfirynowego nie leżą na jednej płaszczyźnie. Można więc określić, że strategia polegała na zmianie pozycji atomów w grupach wokół płaszczyzny pierścienia. Do każdej z czterech wyodrębnionych grup atomów pierścienia FePPIX, które były przemieszczane, należą: jeden atom azotu oraz pięć atomów węgla, tak jak to zaznaczono na rys. 4.3, czyli jeden pierścień pirolowy i jeden mostek metinowy. Położenia atomów w grupie są sztywne, co oznacza, że na stałe ustalone są ich wzajemne pozycje. Parametrami dopasowywanymi były: odległość atomów azotu od centralnego absorbera (dla wszystkich czterech ta sama w założeniach tego modelu), oraz kąty φ i θ w trójwymiarowym układzie dla każdego z atomów azotu oddzielnie. Pozostałe atomy lub atom (dla związków o cząsteczce niedimerowej) zachowywały pozycje, bądź to z wejściowego modelu krystalograficznego, bądź pochodzące z dopasowania EXAFS według strategii pierwszej. W obrębie pierścienia porfirynowego dla większości modeli obowiązywały więzy, co powodowało że m.in. długość wiązania pomiędzy dwoma bliskimi atomami węgla z dwóch różnych grup nie przekracza ustalonych wartości.



Rysunek 4.3. Strategia dopasowania druga. Atomy pierścienia porfirynowego podzielono na cztery grupy. Każda z nich zawiera po pierścieniu pirolowym (cztery atomy węgla plus atom azotu) oraz po atomie węgla łączącym pierścień pirolowy danej grupy z pierścieniem grupy sąsiedniej. Wiązania oznaczone bordowym kolorem oznaczają jednakowe wartości parametrów odległości dla każdego atomu azotu od centralnego absorbera. Strzałki przy atomach azotu wskazują na zmianę ich położenia o kąty φ i θ w układzie radialnym.

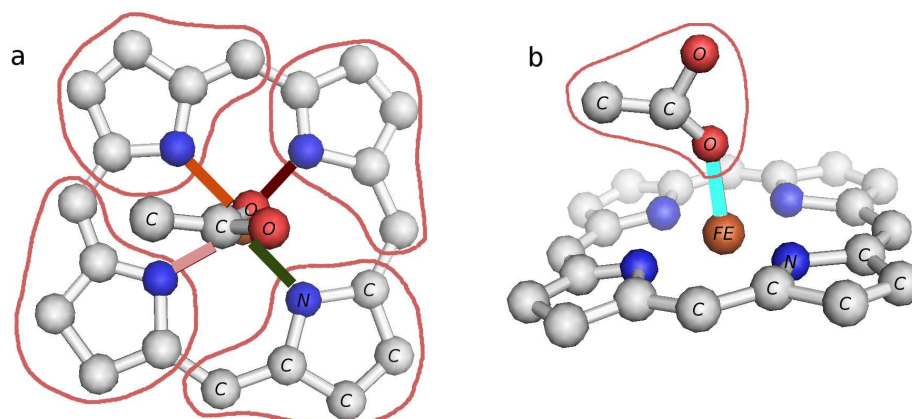
Strategia trzecia, rys. 4.4(a)(b), pozwala na zmianę pozycji pozapierścieniowych atomów lub atomu. W przypadku struktury dimerowej atomy pozapierścieniowe stanowią jedną grupę rys. 4.4(b), w której położenia wzajemne atomów są ściśle określone i nie podlegają zmianie w czasie procesu dopasowania. Parametrami dopasowania w tej strategii są zatem odległość oraz kąty φ i θ najbliższego do centralnego żelaza atomu osiowego tlenu. Sprawdzeniu ulega także pozycja samego centralnego atomu żelaza. Dopasowywana jest też wspólna odległość od absorbera dla azotów przy czym względne położenia atomów w wyróżnionych, tak jak w modelu drugim, grupach w obrębie pierścienia zostają zachowane.



Rysunek 4.4. Strategia dopasowania trzecia. Tak jak w strategii drugiej atomy pierścienia FePPIX podzielono na cztery grupy. Każda z nich zawiera po pierścieniu pirolowym (cztery atomy węgla plus atom azotu), oraz po atomie węgla, łączącym pierścień pirolowy danej grupy z pierścieniem grupy sąsiedniej (a). Grupę stanowią także wszystkie atomy pozapierścieniowe (b). Wiązania oznaczone kolorem bordowym oznaczają tę samą odległość od żelaza dla czterech atomów azotu. Miniaturowe osie układu na atomie żelaza wskazują na odchylenie jego położenia od centrum przyjętego układu. Strzałki na atomie tlenu i wiązanie z atomem żelaza oznaczone kolorem jasnoniebieskim wskazują na zmiany odległości od absorbera, oraz zmianę kątów φ i θ dla tego osiowego atomu.

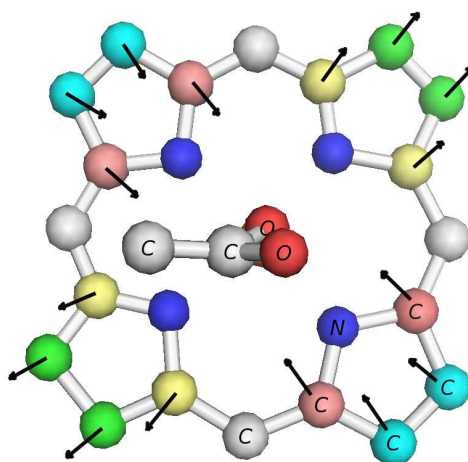
Strategia czwarta rys. 4.5 jest zmodyfikowaną strategią trzecią pozwalającą na wprowadzenie asymetrii w strukturze pierścienia FePPIX poprzez zróżnicowanie odległości czterech atomów azotu. Jednakże nie jest tu już brany jako parametr dopasowania żaden z kątów dla pozycji jakiegokolwiek z atomów, ani odchylenie z ustalonego położenia absorbującego atomu żelaza. Atomy tak jak w modelu strategii trzeciej pozostają podzielone na takie same grupy, a położenia wzajemne atomów w grupie pozostają bez zmian w czasie procedury dopasowania.

Strategia piąta znosi sztywne względne pozycje atomów w określonych grupach. Odrębnie dopasowywany jest parametr odległości od absorbera każdego atomu pozapierścieniowego a w ramach pierścienia każdego atomu azotu. W grupie węgli utworzonych zostaje pięć podgrup, w których atomy dopasowywane są z tą samą wartością parametru odległości od atomu żelaza. Są to cztery grupy złożone z czterech atomów węgla: po dwa atomy węgla w podobnej odległości od atomu żelaza z pierścieni pirolowych usytuowanych naprzeciw siebie. Grupę piątą stanowią cztery atomy węgla typu C_{meso} łączące sąsiednie grupy pirolowe. Sposób połączenia w podgrupy pozwala na sprawdzenie prawdopodobieństwa zaistnienia określonych



Rysunek 4.5. Strategia dopasowania czwarta. Tak jak w strategii drugiej atomy pierścienia porfirynowego podzielono na cztery grupy. Każda z nich zawiera po pierścieniu pirolowym (cztery atomy węgla plus atom azotu), oraz po atomie węgla łączącym pierścień pirolowy danej grupy z pierścieniem grupy sąsiedniej (a). Grupę stanowią także wszystkie atomy pozapierścieniowe (b). Wiązania dla atomów azotu oznaczone różnymi kolorami wskazują na niezależne dopasowywanie ich odległości od centralnego żelaza. Jasno niebieski kolor wiązania (b) wskazuje na zmianę odległości osiowego tlenu od centralnego atomu.

asymetrii pierścienia FePPIX. Jedna z propozycji takiej asymetrii przedstawiona została na rys. 4.6 za pomocą strzałek. Atomy należące do jednej podgrupy zaznaczono tym samym kolorem.



Rysunek 4.6. Wersja piątej strategii dopasowania. Kolorami różowym, żółtym, zielonym i jasnoniebieskim oznaczono atomy węgla w takich samych odległościach od centralnego żelaza z naprzeciw siebie leżących pierścieni pirolowych. Stanowią one cztery grupy. Grupę piątą tworzą pierścieniowe węgle typu C_{meso} oznaczone kolorem szarym. Strzałki wskazują na kierunek odchylenia położenia atomów w stosunku do położenia w wejściowym modelu.

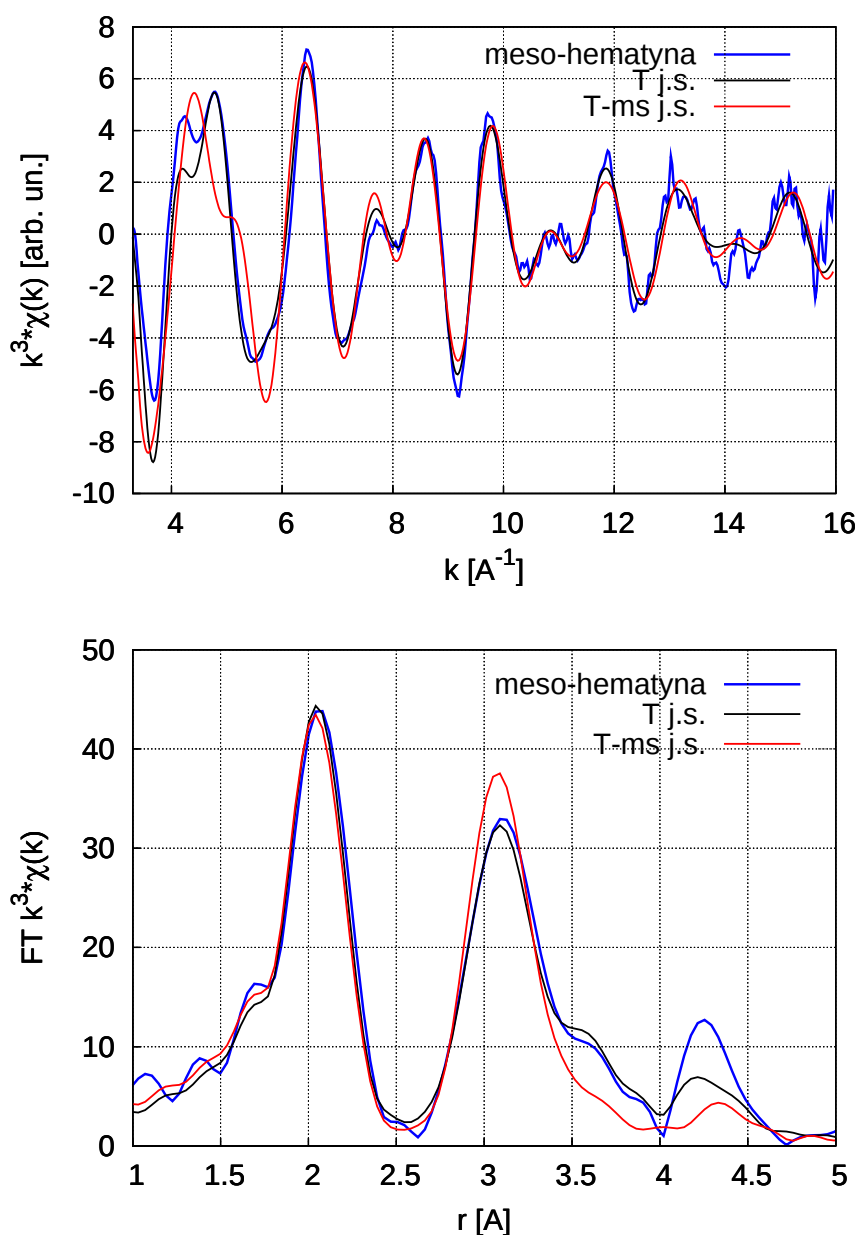
Podobnie jak w strategii pierwszej czynniki Debya-Wallera w pozostałych strategiach dopasowania, zarówno w grupie atomów pierścieniowych jak i pozapierśc-

cieniowych, przyjęto za jednakowe dla atomów tego samego rodzaju znajdujących się w podobnej odległości od atomu absorbującego.

Wszystkie proponowane w niniejszej pracy strategie zostały zastosowane przy dopasowaniach EXAFS w przestrzeni wektora falowego. W celach poglądowych zarówno widmo eksperymentalne jak i teoretycznie wyliczone na podstawie strukturalnego modelu były transformowane do przestrzeni odległości z centrum na atomie absorbującym. Na przykładzie widma meso-hematyny za pomocą wartości parametrów jakości dopasowania R oraz FI , a także graficznie, pokazano dlaczego przy dopasowaniach struktury zawierającej pierścień porfirykowy tak ważne jest branie pod uwagę rozproszeń wielokrotnych. Za pomocą parametrów jakości dopasowania zostanie też pokazane dlaczego w analizie uwzględniono wielokrotne rozpraszanie na dwóch do czterech atomach. Jako przykład posłużyła teoretyczna funkcja dopasowana do eksperymentalnego widma EXAFS meso-hematyny po zastosowaniu strategii piątej i jej modyfikacje. W dopasowaniu według tej strategii uwzględniono rozpraszanie wielokrotne na dwóch do czterech atomach, przy czym założono, że są to co najwyżej trzy różne atomy - czyli wszystkie rodzaje atomów rozpraszających w klastrze dla meso-hematyny. Na rys. 4.7 pokazano eksperymentalną funkcję $\chi(k)$ dla meso-hematyny wraz z dopasowaną teoretyczną funkcją EXAFS, oraz teoretyczną funkcją EXAFS policzoną w oparciu o identyczny model strukturalny, ale bez uwzględnienia jakichkolwiek rozproszeń wielokrotnych. Całkowite usunięcie rozproszeń wielokrotnych podnosi wartość jakości dopasowania R aż o 41 procent jego wartości. Wartość FI wzrasta w tym przypadku o 0.00013. Różnice pomiędzy funkcją teoretyczną EXAFS z i bez rozproszeń wielokrotnych są widoczne w całej przestrzeni wektora falowego k , a w szczególności w zakresie od $3.3\text{\AA}^{-1}$ do $6\text{\AA}^{-1}$. Natomiast w przestrzeni transformaty Fouriera funkcji EXAFS w zakresie powyżej $2.5\text{\AA}$. Brak wkładu od wielokrotnych rozproszeń podnosi amplitudę transformaty teoretycznej funkcji $\chi(k)$ dla jej drugiego pików (w zakresie około $2.8\text{-}3.2\text{\AA}$) i uniemożliwia odtworzenie kształtu transformaty eksperymentalnej funkcji EXAFS w zakresie $3.4\text{-}4\text{\AA}$. W niewielkim stopniu daje się też zauważyć różnice w amplitudach obu teoretycznych funkcji dla pierwszej strefy $2\text{-}2.2\text{\AA}$. Tak duże zmiany powodowane przez wkład od wielokrotnych rozproszeń nie pozwalają na ich pominięcie dla poprawnej interpretacji i analizy widm EXAFS związków o strukturze PPIX.

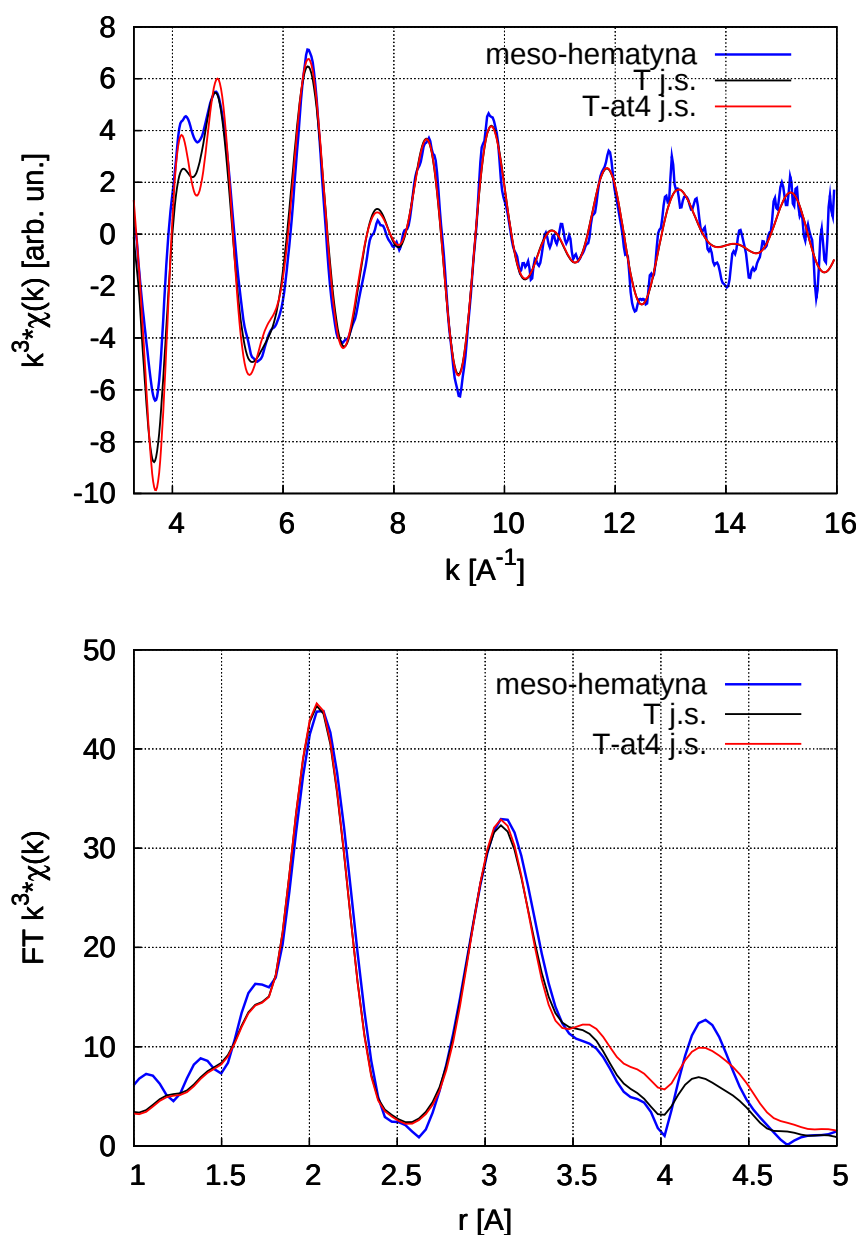
W kolejnym kroku dokonano porównania dopasowanej teoretycznej funkcji $\chi(k)$ i funkcji obliczonej na podstawie tej samej jednostki strukturalnej, ale po zredukowaniu rozproszeń wielokrotnych do rozproszeń na co najwyżej trzech atomach. Obliczone funkcje zestawiono z eksperymentalnym widmem dla meso-hematyny na rys. 4.8. Ograniczenie rozpraszania wielokrotnego zwiększa wartości jakości dopasowania R o 1.4 a FI o 0.00002. Różnice obu teoretycznych funkcji EXAFS są widoczne w przestrzeni wektora falowego w zakresie $3.3\text{\AA}^{-1}$ do $6\text{\AA}^{-1}$ oraz $7.0\text{-}8.0\text{\AA}^{-1}$ a dla ich transformat w zakresie powyżej $3.0\text{\AA}$. Ograniczenie liczby wielokrotnego rozproszenia powoduje gorsze odtworzenie kształtu transformaty Fouriera eksperymentalnego EXAFS w zakresie $3.5\text{-}4.0\text{\AA}$, wciąż jednak zachowując charakterystyczne dwa maksima.

Następnie porównano kształt i jakość dopasowania dla dopasowanej teorety-



Rysunek 4.7. Widmo eksperymentalne EXAFS dla meso-hematyny, wraz z dwoma teoretycznymi funkcjami $\chi(k)$ obliczonymi na podstawie tej samej jednostki strukturalnej zdefiniowanej dla związków o molekuule złożonej z dwóch pierścieni protoporfiryny IX. Dla teoretycznej funkcji EXAFS oznaczonej T j.s. wzięto pod uwagę wielokrotne rozproszenia do rozproszeń czterokrotnych - T j.s. Przy obliczaniu teoretycznej funkcji EXAFS oznaczonej T-ms j.s. rozproszenia wielokrotne nie zostały wzięte pod uwagę. Poniżej transformata Fouriera widma eksperymentalnego i dwóch porównywanych funkcji. W rozpatrywanym klastrze rozpraszania wielokrotne mają wpływ już na pierwszą strefę, czyli mogą modyfikować informacje o położeniach czy czynnikach Deby' a-Wallera atomu tlenu i czterech atomów azotu.

cznej funkcji $\chi(k)$ obliczonej na podstawie jednostki strukturalnej dla cząsteczki dimerowej i teoretycznej funkcji obliczonej na podstawie tej jednostki po usunięciu atomów pozapierścieniowych oprócz tlenu osiowego, rys. 4.9. Wartości jakości

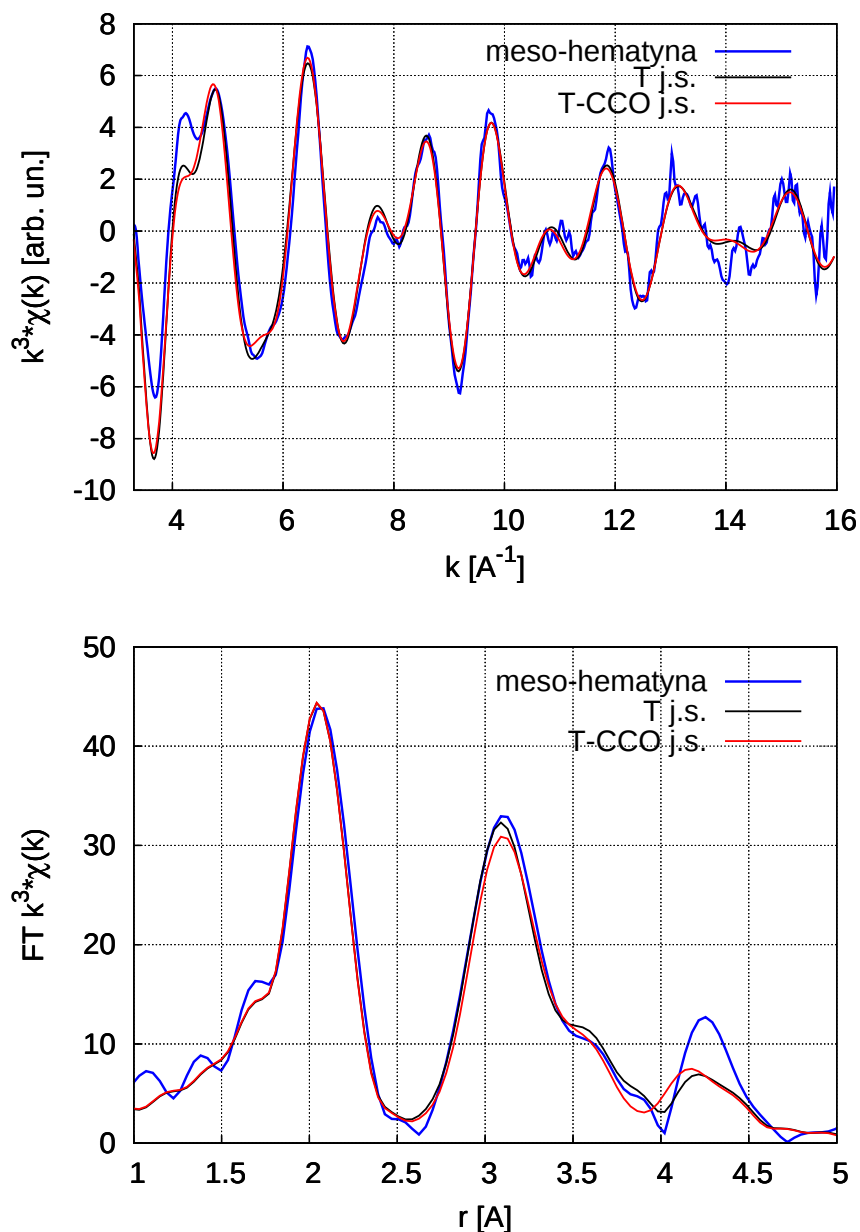


Rysunek 4.8. Widmo eksperymentalne EXAFS dla meso-hematyny wraz z dwoma teoretycznymi funkcjami EXAFS obliczonymi na podstawie tej samej jednostki strukturalnej zdefiniowanej dla związków o molekuule złożonej z dwóch pierścieni protoporfiryny IX. Do policzenia teoretycznej funkcji EXAFS oznaczonej T j.s. wzięto pod uwagę wielokrotne rozproszenia do rozprośnień czterokrotnych. Dla policzenia drugiej oznaczonej jako T-at4 j.s. wzięto pod uwagę rozproszenia wielokrotne do rozprośnień trzykrotnych. Poniżej transformaty Fouriera widma eksperymentalnego i dwóch porównywanych funkcji. Ocena rozkładu radialnego pozwala na wniosek, że uwzględnienie rozprośnień czterokrotnych pozwala na dokładniejsze odtworzenie transformaty eksperymentalnego widma EXAFS w zakresie od $3.5\text{\AA}$ do $4\text{\AA}$.

dopasowania R wzrasta o 1.35 po usunięciu dwóch pozapierścieniowych atomów węgla i tlenu. Wartości FI wzrasta o 0.00001. Niewielkie Różnice teoretycznych funkcji EXAFS zaobserwowano w całej przestrzeni wektora falowego, natomiast

dla transformat Fouriera w zakresie od $3.0\text{\AA}$. W szczególności transformata funkcji $\chi(k)$ policzona dla zredukowanego strukturalnego modelu nie odtwarza dwóch maksimów w zakresie $3.5\text{-}4.0\text{\AA}$ - widoczne jest tylko jedno.

Do poprawnej interpretacji widma niezbędne jest przede wszystkim wzięcie pod uwagę wielokrotnych rozproczeń. Ze względu na porównywalną różnicę dla jakości dopasowania dwu teoretycznych funkcji EXAFS: policzonej przy zredukowanej atomowej strukturze modelu i przy ograniczeniu do rozproczeń wielokrotnych na co najwyżej trzech atomach, dopasowywano funkcje $\chi(k)$ przy uwzględnieniu wielokrotnych rozproczeń na dwóch do czterech atomach.



Rysunek 4.9. Widmo eksperymentalne EXAFS meso-hematyny wraz z dwoma teoretycznymi funkcjami $\chi(k)$. Jedną z nich, oznaczoną jako T j.s. obliczono na podstawie jednostki strukturalnej zdefiniowanej dla związków o molekuule złożonej z dwóch pierścieni protoporfiryny IX. Teoretyczna funkcja EXAFS oznaczona jako T-CCO j.s. została policzona na podstawie modelu molekuły złożonej z dwóch pierścieni protoporfiryny IX zredukowanego o dwa pozapłaszczyznowe węgle i jeden pozapłaszczyznowy tlen - tak jak to ma miejsce w jednostce strukturalnej związku o cząsteczce zbudowanej z pojedynczego pierścienia PPIX. Dolny rysunek przedstawia transformatę Fouriera wszystkich trzech funkcji. W rozkładzie radialnym największe różnice pomiędzy obiema funkcjami teoretycznymi są w zakresie 3.5-4.0 $\text{\AA}$, oraz w 3-3.1 $\text{\AA}$, gdzie widać spadek amplitudy dla funkcji o okrojonym modelu.

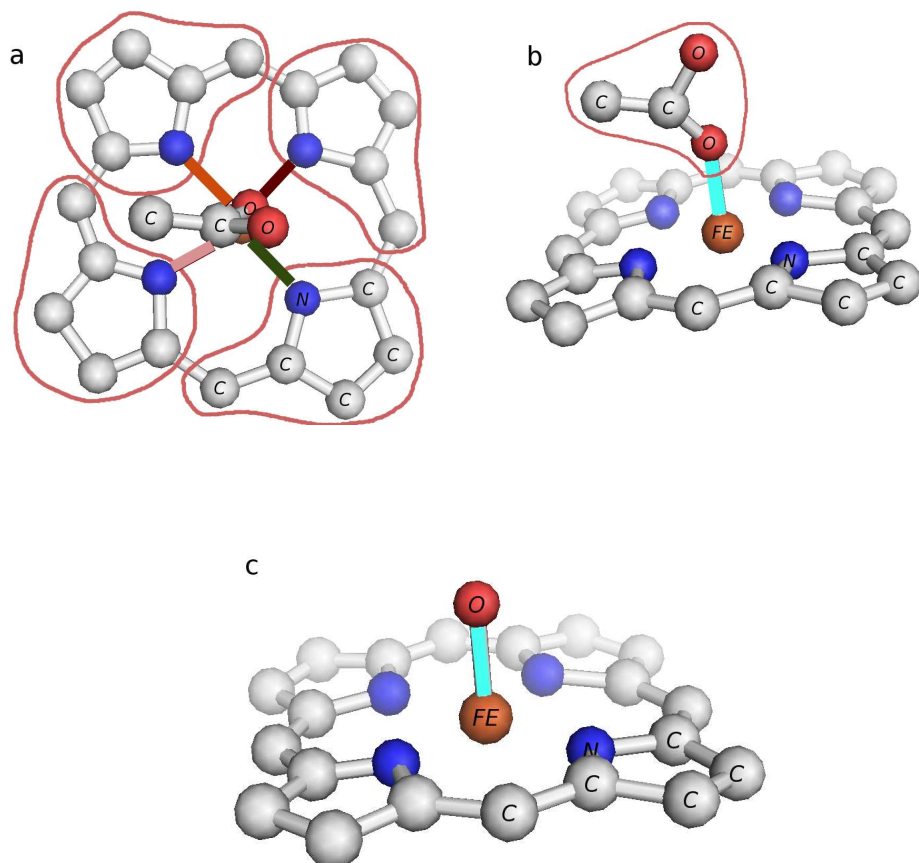
4.1.2 Roztwory

Widma roztworów były dopasowywane z takimi samymi założeniami jak widma materiałów proszkowych. Uwzględniono wkład od wielokrotnego rozpraszania na dwóch do czterech atomach. Zakres wartości wektora falowego, w którym analizowano widma roztworów, został skrócony do $13\text{\AA}^{-1}$ dla meso-hematyny w kwasie octowym i do $12\text{\AA}^{-1}$ i $13\text{\AA}^{-1}$ dla meso-hematyny w dimetylosulfotlenku, co wpłynęło na zmniejszenie dokładności określenia parametrów odległości dla atomów lub ich grup. W szczególności dotyczy to odległości dla atomów tego samego rodzaju i tak samo oddalonych od absorbującego atomu żelaza, jak np. cztery atomy azotu. W transformacie Fouriera ograniczonej do zakresu $12\text{--}13\text{\AA}^{-1}$ funkcji $\chi(k)$ roztworów, jak też proszkowej meso-hematyny brak charakterystycznych dwóch maksimumów w zakresie $3.5\text{--}4.0\text{\AA}$. Nie świadczy to o braku pozapierścieniowych atomów wiązania mostka tlenowego, lecz o większej niepewności określenia ich pozycji. To czy pozapierścieniowe dwa atomy węgla i jeden atomu tlenu powinny, lub nie powinny być uwzględnione w proponowanym strukturalnym modelu oceniano na podstawie parametru nieuporządkowania tlenu osiowego. W pierwszym etapie dopasowania funkcji $\chi(k)$ dla roztworów przyjęto strategię taką samą jak opisana w poprzednim podrozdziale strategia pierwsza dla materiałów proszkowych. Dla roztworów kwasu octowego dopasowanie wykonano w oparciu o model jednostki strukturalnej cząsteczki niedimerowej. Natomiast dla roztworów dimetylosulfotlenku stosowano model cząsteczki złożonej z dwóch pierścieni FePPIX. Ponieważ zastosowane w etapie pierwszym dopasowania modele jednostek strukturalnych okazały się niewystarczające do dobrego dopasowania większości rozpatrywanych funkcji $\chi(k)$ modyfikowano modele strukturalne. Etap drugi dopasowania polegał na dodaniu w określonym położeniu względem absorbującego atomu żelaza atomów tlenu, węgla i azotu do strukturalnego modelu, oraz dopasowania ich odległości od absorbera, czynników Debya-Wallera, oraz liczby koordynacyjnej.

4.2 Strategia przyjęta do analizy XANES związków na bazie protoporfiryny IX

Strategia dopasowania dla XANES, rys. 4.10, polegała na dopasowaniu parametru odległości dla każdego atomu azotu w pierścieniu PPIX, oraz atomu osiowego tlenu i ewentualnie dodatkowego lub dodatkowych atomów spoza uwzględnianej jednostki strukturalnej. Każdy z atomów azotu należał do grupy atomów pierścienia pirolowego i jednego z atomów węgla typu C_{meso} - mostka metinowego co pokazano na rys. 4.10(a). Atom tlenu osiowego jednostki połączono w grupę z pozostałymi atomami tworzącymi strukturę wiązania mostka tlenowego, rys. 4.10(b), w przypadku rozpatrywanej jednostki strukturalnej dla dimeru. Atomy, które dodano do modelu jednostki strukturalnej były traktowane jako oddzielne - nie sortowano je w grupy ani nie dołączano do grup jednostki strukturalnej. Atomy w grupach zachowywały te same pozycje względem siebie. W odróżnieniu od parametrów EXAFS dla XANES nie uwzględniano nieuporządkowania strukturalnego, traktując badany materiał jako materiał złożony z identycznych cząsteczek. Używane pro-

gramy (FEFF, MXAN) nie pozwalały również na uwzględnienie ułamkowej liczby koordynacyjnej dla atomów w rozpatrywanym modelu.



Rysunek 4.10. Strategia dopasowania XANES przy uwzględnieniu modelu jednostki strukturalnej. Atomy pierścienia porfiryнового podzielono na cztery grupy. Każda z nich zawierała po pierścieniu pirolowym (cztery atomy węgla plus atom azotu), oraz po atomie węgla łączącym pierścień pirolowy danej grupy z pierścieniem grupy sąsiedniej (a). Grupę stanowiły także wszystkie atomy pozapierścieniowe (b), lub jeden osiowy atom tlenu dla modelu jednostki strukturalnej cząsteczki o pojedynczym pierścieniu PPIX (c). Wiązania dla atomów azotu oznaczone różnymi kolorami wskazują na niezależne dopasowywanie ich parametrów odległości. Jasno niebieski kolor wiązania (b)(c) wskazuje na zmianę odległości osiowego atomu tlenu od absorbera.

Rozdział 5

Wyniki oraz dyskusja

Abstrakt

Rozdział poświęcono omówieniu wyników analizy eksperymentalnych widm EXAFS i XANES uzyskanych dla potencjalnego substytutu hemozoiny - rozpuszczalnej meso-hematyny, oraz alaninowej pochodnej PPIX, będącej półproduktem potencjalnego kandydata na fotouczulacz w terapii i diagnostyce nowotworów. Oba związki badano w postaci mikrokrystalicznego proszku. Przeprowadzono również pomiary i analizę widm XAFS meso-hematyny rozpuszczonej w dimetylosulfotlenku - DMSO, oraz kwasie octowym bez i z dodatkiem wody. Powyższe roztwory zostały także przebadane po dodaniu antymalarycznego leku - chlorochininy. Stwierdzono, że meso-hematyna jako proszek ma strukturę podobną do β -hematyny, a zatem tak jak i ta ostatnia może być wykorzystywana w testowaniu nowych leków. W kwasie octowym dimerowa cząsteczka meso-hematyny ulega najprawdopodobniej rozkładowi na cząsteczki o pojedynczej FePPIX i nie stwierdzono obecności dodatkowych atomów mogących należeć do cząsteczki chlorochininy w odległości do 3.5 Å od absorbującego atomu żelaza. W roztworze dimetylosulfotlenku cząsteczka meso-hematyny pozostaje cząsteczką dimerową a lokalne otoczenie żelaza ulega zmianie po dodaniu chlorochininy. W strukturze alaninowej pochodnej PPIX określono miejsce wiązania dwóch atomów ciężkich: żelaza i bromu.

5.1 Struktura substytutu pigmentu malarii jako związku mikrokrystalicznego

Meso-hematyna jest, jak już zostało omówione w Rozdziale 2, laboratoryjnie wytworzonym substytutem hemozoiny o strukturze określonej w oparciu o niepublikowane dotychczas (D.S. Bohle) dane krystalograficzne. Budowa jej dimerowej, czyli złożonej z dwóch cząsteczek FePPIX, molekuly została przedstawiona na rys. 2.3. W zamyśle miałyby ona zastąpić ekstrahowaną z zarażonych pasożytem malarii erytrocytów hemozoinę w przeprowadzanych badaniach laboratoryjnych. Proces ekstrakcji tego naturalnego produktu pasożyta jest drogi i nie każde laboratorium chemiczne pracujące nad znalezieniem skutecznego antymalarycznego leku posiada odpowiednią licencję na przechowywanie i prace nad zainfekowanymi ery-

trocytami. Meso-hematyna byłaby ponadto lepszym substytutem niż β -hematyna - związek o również dimerowej budowie cząsteczki (rys. 2.2), gdyż jest od niej znacznie lepiej rozpuszczalna w rozpuszczalnikach organicznych. W cząsteczce zarówno β -hematyny jak i hemozoiny pierścienie FePPIX łączą się ze sobą za pomocą tzw. mostków tlenowych, gdzie atom tlenu pochodzący z grupy propylowej jednej molekuly protoporfiryny IX wiąże się z atomem żelaza sąsiedniego pierścienia.

W przedstawionym rozdziale omówiono rezultaty analizy widm absorpcyjnej spektroskopii rentgenowskiej na mikrokrystalicznej próbce meso-hematyny. Otrzymane wyniki porównano do wyników uzyskanych dla mikrokrystalicznej próbki β -hematyny, oraz hematyny - związku o cząsteczce złożonej z pojedynczej molekuly ferriprotoporfiryny FePPIX, scharakteryzowanych tą samą techniką. Eksperymentalne widma EXAFS i XANES przedstawione w tym rozdziale uzyskano na próbkach w postaci proszku. Dodatkowo przedstawiono rezultaty analizy EXAFS dla meso-heminy.

Absorpcyjna spektroskopia rentgenowska EXAFS jest w stanie określić jedynie lokalne otoczenie pierwiastka, którego absorpcyjną krawędź mierzono. Struktura dimerowej cząsteczki została więc z konieczności ograniczona do jednej molekuly ferriprotoporfirynowej FePPIX, a raczej jej trzonu z centralnym absorbującym atomem żelaza bez grup propylowych, oraz do części grupy propylowej sąsiadującej molekuly FePPIX, która tworzy mostek tlenowy pomiędzy dwoma pierścieniami (rys. 4.1). Jako dane wejściowe położeń atomów do analizy EXAFS, zarówno β -hematyny jak i mesohematyny, wykorzystano dane krystalograficzne uzyskane bezpośrednio od zespołu (grupa D.S. Bohle'a), który przeprowadził eksperyment i jest jednocześnie zespołem syntezującym dimerowe związki. Dla β -hematyny dane te były wcześniej opublikowane [37] i stanowiły podstawę do określenia jej strukturalnej budowy jako związku o cząsteczce dimerowej, natomiast dla meso-hematyny nie były szerzej udostępnione. Odległości od centralnego atomu żelaza, a w przeprowadzonym pomiarze absorpcji rentgenowskiej - atomu absorbującego, do wszystkich pozostałych atomów w promieniu nie większym niż $4.4\text{\AA}$ zostały umieszczone w tab. 5.1. Odległości pomiędzy atomami zostały przedstawione z taką dokładnością jak w konwencji przyjętej dla plików .PDB (pochodzących z bazy Protein Data Bank), gdzie podaje się wyznaczone krystalograficznie położenia poszczególnych atomów dla struktur cząsteczkowych złożonych molekuł. Rzeczywista niepewność określenia tych parametrów poprzez pomiar, oraz analizę danych eksperymentalnych nie jest autorowi niniejszej rozprawy znana. Ze względu na to, że nie dysponowano danymi badań krystalograficznych wykonanych na posiadanych mikrokrystalicznych próbkach o cząsteczce złożonej z pojedynczego pierścienia protoporfiryny IX - hematyna, meso-hemina, jako wejściowymi danymi położeniowymi atomów w analizie EXAFS tych związków posłużono się pozycjami atomów wyznaczonymi z danych krystalograficznych dla cząsteczki β -hematyny, odrzucając jednakże pozapierścieniowe dwa atomy węgla i jeden atom tlenu, oraz zamieniając najbliższy do atomu żelaza atomu tlenu atomem chloru dla meso-heminy.

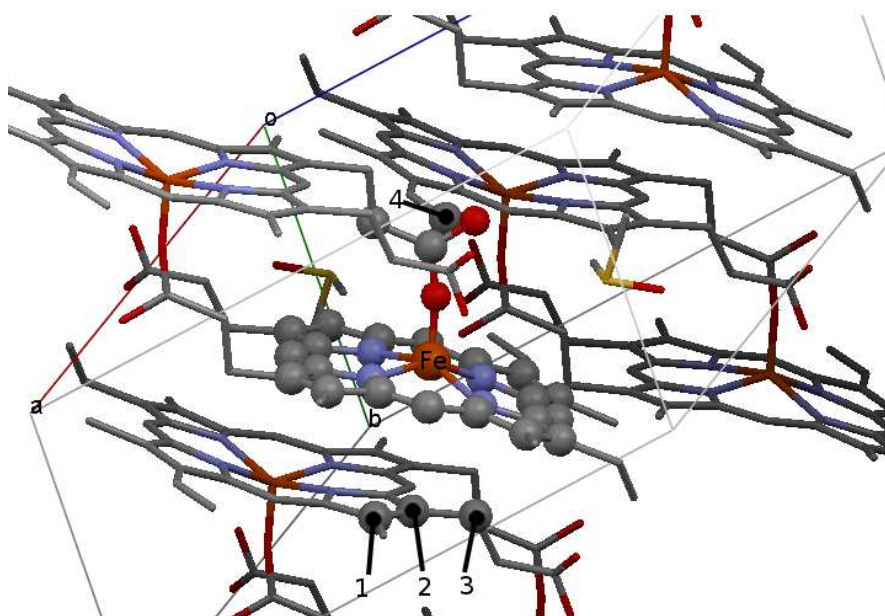
Należy zwrócić uwagę, że w tab. 5.1 poszczególne atomy w strukturze β -hematyny nie odpowiadają symetrycznym pozycjom w strukturze meso-hematyny

β -hematyna		meso-hematyna	
atom	r(atom-Fe)	atom	r(atom-Fe)
O p.p	1.893	O p.p	1.664
N	2.046	N	2.046
N	2.054	N	2.055
N	2.066	N	2.067
N	2.079	N	2.080
C	3.056	C p.p.	2.948
C	3.074	C	3.056
C	3.076	C	3.074
C	3.080	C	3.076
C	3.101	C	3.080
C	3.106	C	3.100
C p.p	3.110	C	3.107
C	3.118	C	3.118
C	3.120	C	3.119
C	3.439	C	3.439
C	3.458	C	3.459
C	3.462	C	3.461
C	3.467	C	3.467
C p.p	3.733	O p.p	3.834
C p.p.n.c.	3.806	C p.p.	3.849
O p.p	4.055	C p.p.n.c.	4.083
C	4.281	C p.p.n.c.	4.093
C	4.288	C p.p.n.c.	4.180
C	4.291	C p.p.n.c.	4.251
C	4.302	C	4.281
C	4.304	C	4.289
C	4.332	C	4.291
C	4.340	C	4.302
C p.p.n.c.	4.342	C	4.304
C	4.363	C	4.331
		C	4.340
		C	4.363

Tabela 5.1. Zestawienie odległości atomów cząsteczek β -hematyny i meso-hematyny od absorbującego atomu żelaza w promieniu do 4.4Å od atomu żelaza, określonych przy pomocy badań krystalograficznych (β -hematyna - [37], mesohematyna - niepublikowane dane D.S.Bohle). Oznaczenie p.p. wskazuje na atom znajdujący się poza płaszczyzną pierścienia protoporfiryny IX i będący składową wiązania mostka tlenowego. Oznaczenie p.p.n.c. wskazuje na atom znajdujący się poza płaszczyzną pierścienia protoporfiryny IX i nienależący do struktury dimeru, do której należą wszystkie pozostałe atomy.

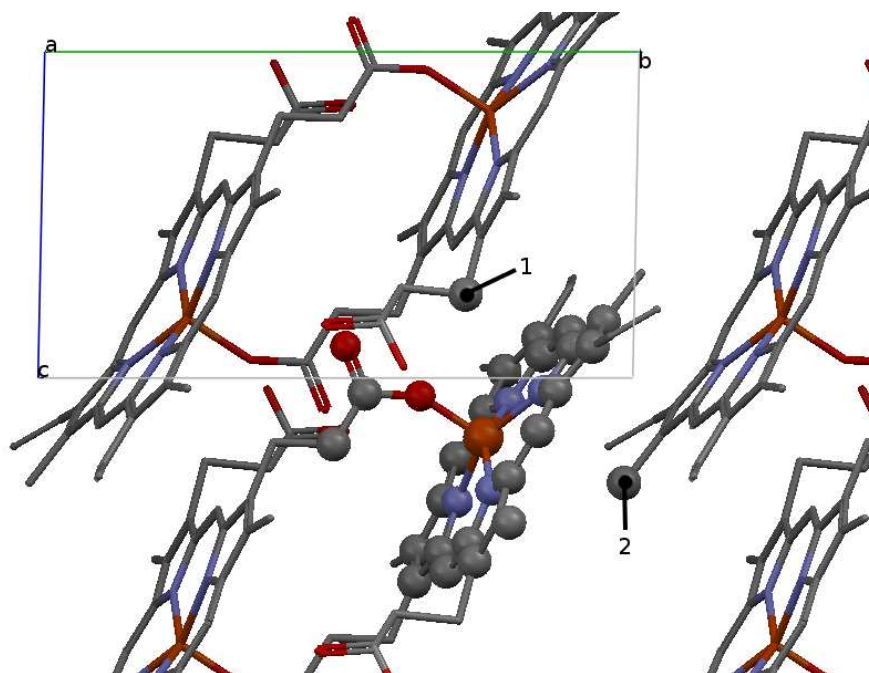
a przedstawione są w kolejności rosnącej odległości od centralnego absorbującego atomu żelaza. Daje się zaobserwować następujące prawidłowości: zarówno pierwsza (cztery atomy azotu), druga (osiem atomów węgla), trzecia (cztery atomy węgla) jak i czwarta strefa ośmiu węgli w pierścieniu jest niemal identycznie odległa od atomu Fe dla struktur obu związków (średnie odległości w tych strefach są takie same dla obydwu struktur i wynoszą dla stref odpowiednio: 2.06Å, 3.09Å, 3.46Å,

4.31Å). Istnieje natomiast różnica w odległościach dla wszystkich atomów wiązania mostka tlenowego w tzw. płaszczyźnie osiowej (lub inaczej to określając dla atomów wiązania mostka tlenowego spoza płaszczyzny pierścienia ferriprotoporfiryny IX oznaczonych w tab. 5.1 skrótem p.p.). Pozapłaszczyznowy atom tlenu wiązania mostkowego położony najbliżej do atomu żelaza jest od niego w odległości 1.66Å dla meso-hematyny, podczas gdy dla β -hematyny ta odległość wynosi już 1.89Å. Kolejne z wiązania mostka pozapłaszczyznowe pierwszy węgiel i drugi tlen są bliżej absorbera w strukturze meso-hematyny niż β -hematyny o odpowiednio: 0.16Å i 0.22Å, a drugi pod względem oddalenia od atomu Fe węgiel jest w strukturze meso-hematyny dalej o 0.12Å. Według danych krystalograficznych wśród atomów oddalonych o mniej niż 4.4Å dla struktury meso-hematyny znajdują się cztery dodatkowe atomy węgla, z dwóch odrębnych cząsteczkowych dimerów, bliżej centralnego Fe niż atomy węgla z czwartej strefy pierścienia. Atomy te oznaczono w tab. 5.1 jako p.p.n.c i są one umieszczone w odległościach: 4.083Å, 4.093Å, 4.180Å, 4.251Å od centralnego absorbera, rys. 5.1. Dla struktury β -hematyny istnieją dwa takie atomy węgla w odległościach 3.806Å i 4.342Å, także z dwóch innych cząsteczkowych dimerów, co pokazano na rys. 5.2.



Rysunek 5.1. Wielocząsteczkowa struktura budowy meso-hematyny z wyróżnieniem atomów znajdujących się w odległości mniejszej niż 4.4Å, czyli atomów pierścienia FeP-PIX, atomów mostka tlenowego, trzech atomów węgla (1 2 3) dimeru sąsiadnego i jednego atomu węgla (4) kolejnego dimeru sąsiadującego na tle komórki elementarnej o wyróżnionym początku i osiach a i b.

Atomy pozapłaszczyznowe nienależące do wiązania mostka tlenowego nie zostały uwzględnione w wejściowych danych strukturalnych wykorzystywanych przy dopasowaniu funkcji EXAFS z dwóch powodów. Po pierwsze nie należą one do struktury dimerowej danej cząsteczki tylko do sąsiadujących dimerów, których położenie w przestrzeni najlepiej wyznaczają ich atomy żelaza. Tymczasem najbliższy atom żelaza od wybranego żelazowego absorbera dla struktury związku meso-hematyny znajduje się w odległości 6.37Å a dla struktury β -hematyny 7.86Å,



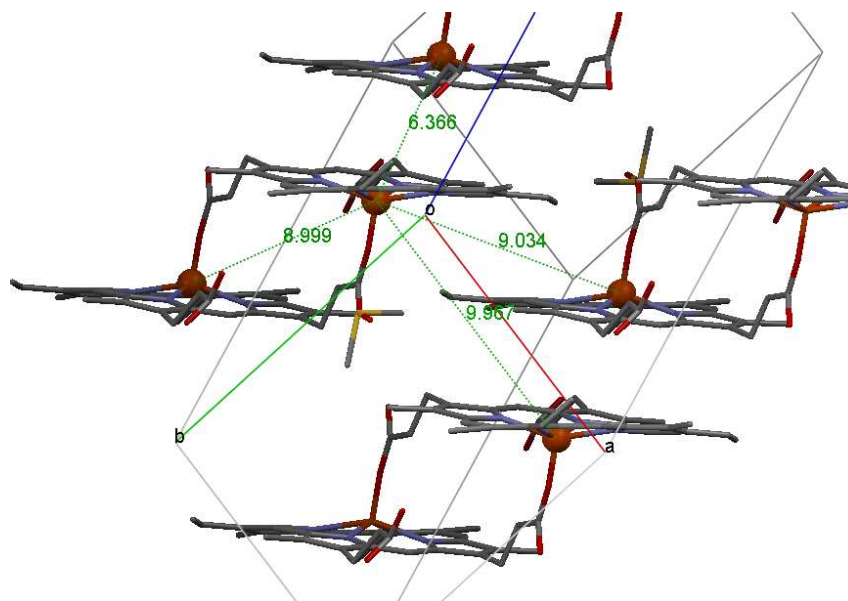
Rysunek 5.2. Wielocząsteczkowa struktura budowy β -hematyny z wyróżnieniem atomów znajdujących się w odległości mniejszej niż $4.4\text{\AA}$ czyli atomów pierścienia FePPiX, atomów mostka tlenowego i po jednym atomie węgla (1 2) z dwóch sąsiednich dimerowych cząsteczek na tle komórki elementarnej o wyróżnionych osiach b i c, oraz osią a skierowaną do czytelnika.

co przedstawiono odpowiednio na rys. 5.3 i rys. 5.4. Czułość analizy EXAFS dla tych odległości w analizowanym typie układu atomów jest niewystarczająca. Nie można zatem stwierdzić za pomocą metody rentgenowskiej absorpcji czy cząsteczki dimerów są przesunięte względem siebie w taki sposób, że należałoby uwzględnić atomy węgla w odległości $4.4\text{\AA}$ od Fe w klastrze danego dimeru lub też je pominąć. Zdecydowano zatem uwzględnić w analizie jednakową liczbę atomów węgla w podobnym początkowym modelu struktury. Model ten różnił się odległościami poszczególnych atomów pozapierścieniowych należących do wiązania mostka tlenowego od absorbera dla meso-hematyny i β -hematyny. Ponadto wstępna analiza EXAFS wykazała podobne położenie atomów pozapierścieniowego tlenu w strukturze obydwu związków i naturalnym wydawało się sprawdzenie dokładnie tego samego modelu w obu przypadkach.

5.1.1 Analiza widm EXAFS

• **Struktura związku meso-hematyny w porównaniu do struktury innego substytutu hemozoiny - β -hematyny, oraz związku niedimerowego.**

Eksperymentalne funkcje EXAFS $\chi(k)$, oraz ich transformaty Fouriera dla zestawu meso-hematyna i β -hematyna pokazano na rys. 5.5, a dla zestawu meso-hematyna i hematyna na rys. 5.6. Ze względu na większe zaszumienie widma β -hematyny trudno wskazać różnice w porównaniu z widmem dla meso-hematyny w funkcji $\chi(k)$. Dla zakresu $14\text{--}14.5\text{\AA}^{-1}$ dla widma meso-hematyny występuje wyraźna struk-

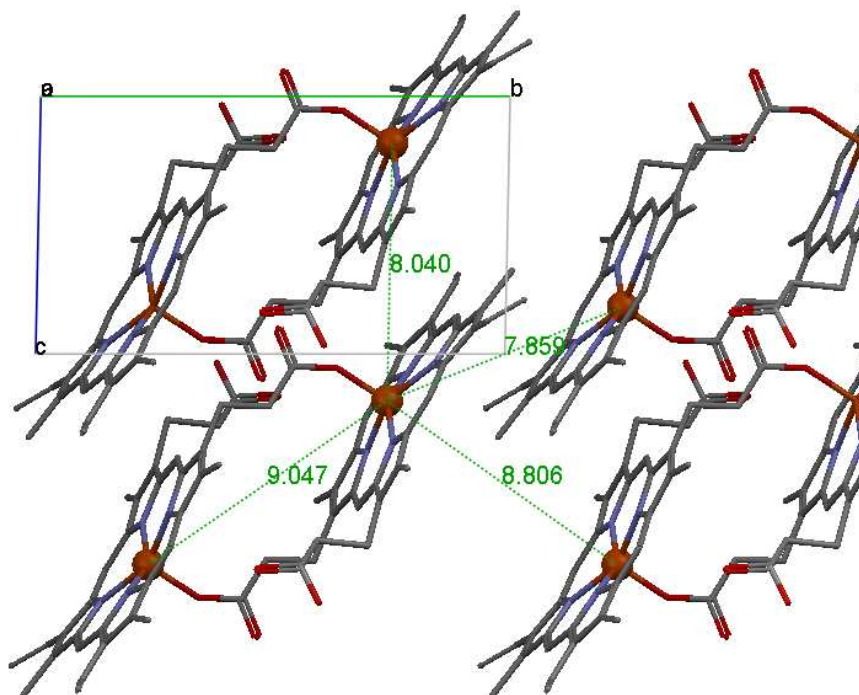


Rysunek 5.3. Struktura mikrokryształitu meso-hematyny wyznaczona z danych krytalograficznych z wyróżnieniem odległości czterech najbliższych absorbującego atomu żelaza atomów tego samego pierwiastka umieszczonych w centrach pierścieni PPIX tej samej, oraz trzech innych sąsiadujących cząsteczek dimerowych na tle komórki elementtarnej z wyróżnionym początkiem oraz osiami a i b.

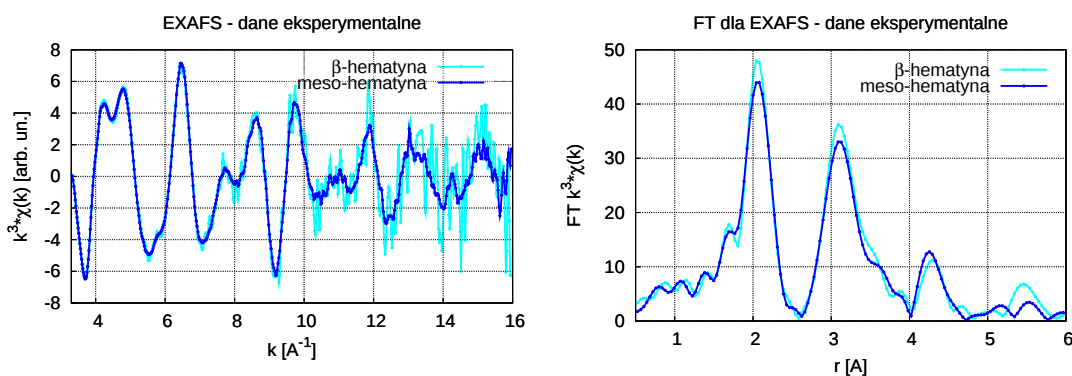
tura, gdy tymczasem dla funkcji $\chi(k)$ β -hematyny nie jest to oczywiste. Transformata Fouriera funkcji $\chi(k)$ obydwu związków wskazuje na większe uporządkowanie atomów w strefie czterech atomów azotu, oraz ośmiu atomów węgla dla β -hematyny - amplituda transformaty jej widma w zakresie $2-3.2\text{\AA}$ jest wyraźnie wyższa. Jest także widoczna różnica dla zakresu $3.4-4.0\text{\AA}$, gdzie występują dwa lokalne maksima. Bardzo prawdopodobne, że na ich powstanie mają wpływ atomy znajdujące się poza płaszczyzną pierścienia FePPIX, co potwierdzałyby krytalograficznie wyznaczone różnice w położeniach atomów stanowiących wiązanie mostka tlenowego lub też różnice w położeniu innych atomów pozapierścieniowych należących do sąsiadujących dimerów.

Zdecydowanie większe różnice można zaobserwować w zestawieniu funkcji $\chi(k)$ meso-hematyny z funkcją $\chi(k)$ dla hematyny, w szczególności w zakresie $4-6\text{\AA}^{-1}$, $7.5-8.8\text{\AA}^{-1}$, oraz $12.8-15\text{\AA}^{-1}$. Nie zaobserwowano dodatkowej struktury, bardzo wyraźnej dla widma meso-hematyny, w zakresie $14-14.5\text{\AA}^{-1}$ dla hematyny, mimo podobnego poziomu szumu w obu widmach. Transformata Fouriera $\chi(k)$ obu związków różni się w zakresie $1.6-1.8\text{\AA}$ a przede wszystkim w zakresie $2.8-4.0\text{\AA}$. Dla transformaty $\chi(k)$ hematyny w zakresie $3.4-4.0\text{\AA}$ występuje tylko jedno maksimum, a że jest to związek o cząsteczce o pojedynczym pierścieniu FePPIX potwierdzałoby to przypuszczenie, że dwa maksima wskazują na występowanie innych niż w jednostce strukturalnej dla monomeru atomów w tym zakresie odległości od absorbera.

Zarówno eksperymentalna funkcja $\chi(k)$ jak i jej transformata Fouriera dla meso-hematyny wykazują większe podobieństwo do $\chi(k)$ i jej transformaty dla β -hematyny niż hematyny, czyli do związku o cząsteczce o podwójnym pierścieniu



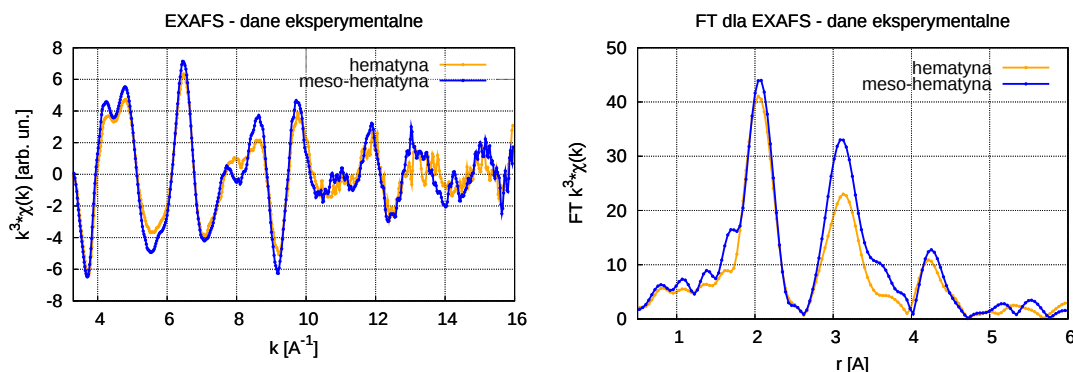
Rysunek 5.4. Struktura mikrokrysztytu β -hematyny wyznaczona z danych krystalograficznych z wyróżnieniem odległości czterech najbliższych do centralnego atomu żelaza atomów tego samego pierwiastka umieszczonych w centrach pierścieni PPIX tej samej, oraz trzech innych sąsiadujących cząsteczek dimerowych na tle komórki elementarnej z wyróżnionymi osiami b i c, oraz osią a skierowaną do czytelnika.



Rysunek 5.5. Dane eksperymentalne EXAFS: funkcja $\chi(k)$, oraz jej transformata Fouriera dla meso-hematyny - kolor niebieski w zestawieniu z danymi dla β -hematyny - kolor jasnoniebieski.

FePPIX niż do związku o cząsteczce złożonej z pojedynczej molekuly FePPIX. Mając wejściowe modele jednostek strukturalnych o określonych pozycjach atomów w przestrzeni trójwymiarowej dopasowanie widma EXAFS rozpoczęto od strategii pierwszej opisaną w rozdziale czwartym. Tab. 5.2 zawiera wyniki dopasowania dla wszystkich trzech związków.

Najlepsze dopasowanie z wartością $R = 28.29$ oraz $FI = 0.00007$ uzyskano



Rysunek 5.6. Dane eksperymentalne EXAFS: funkcja $\chi(k)$, oraz jej transformata Fouriera dla meso-hematyny - kolor niebieski w zestawieniu z danymi dla hematyny - kolor pomarańczowy.

	meso-hematyna		β -hematyna		hematyna	
R	28.29		38.85		30.82	
FI	0.00007		0.00012		0.00008	
EF	-3.8 ± 0.4		-3.5 ± 0.7		-4.0 ± 0.4	
X	r(Fe-X) [Å]	$2\sigma^2$	r(Fe-X) [Å]	$2\sigma^2$	r(Fe-X) [Å]	$2\sigma^2$
O os.	1.89 ± 0.01	0.012 ± 0.003	1.88 ± 0.01	0.008 ± 0.002	1.86 ± 0.01	0.021 ± 0.002
4N	2.075 ± 0.004	0.0076 ± 0.0006	2.071 ± 0.003	0.0056 ± 0.0006	2.066 ± 0.003	0.0091 ± 0.0006
8C$_{\alpha}$	3.094 ± 0.005	0.0063 ± 0.0005	3.095 ± 0.004	0.0052 ± 0.0009	3.088 ± 0.004	0.0117 ± 0.0007
4C$_{meso}$	3.48 ± 0.01	0.008 ± 0.002	3.46 ± 0.02	0.005 ± 0.002	3.43 ± 0.02	0.018 ± 0.002
8C$_{\beta}$	4.29 ± 0.02	0.020 ± 0.004	4.26 ± 0.02	0.023 ± 0.006	4.27 ± 0.02	0.022 ± 0.005

Tabela 5.2. Zestawienie parametrów dopasowania według strategii pierwszej dla trzech związków w postaci mikrokryształicznej: meso-hematyny, β -hematyny i hematyny. Dopasowanie według strategii pierwszej.

dla meso-hematyny, zaś najgorsze z wartością $R = 38.85$ i $FI = 0.00012$ dla β -hematyny. Należy jednak wziąć pod uwagę to, że stosunek szumu do sygnału w widmie dla β -hematyny jest wyższy niż dla meso-hematyny i stąd możemy oczekiwać różnicy w czynnikach dopasowania obydwu związków. Porównując parametry dopasowania umieszczone w tab. 5.2 można zaobserwować następujące prawidłowości: odległości atomów od centralnego żelaza są największe dla wszystkich grup atomów w dopasowanym modelu dla meso-hematyny. W przedziale niepewności pomiarowych wyznaczonych dla dopasowanych parametrów meso-hematyny zawarte są wartości parametrów dopasowanych dla struktury β -hematyny dla tlenu osiowego - O os., grupy czterech atomów azotu - 4N, oraz grupy ośmiu atomów węgla - 8C $_{\alpha}$. Różnice w tych samych strefach atomów między dopasowanymi odległościami dla struktury meso-hematyny i hematyny wynoszą odpowiednio: 0.03Å, 0.009Å i 0.006Å co za wyjątkiem odległości Fe-O os. nie jest różnicą znaczącą. Niektóre określone przez dopasowanie dla meso-hematyny i β -hematyny przedziały wartości odległości od atomu absorbującego nie zawierają średnich wartości dla poszczególnych stref określonych z danych krystalograficznych: 4N - 2.06Å, 8C $_{\alpha}$ - 3.09Å, 4C $_{meso}$ - 3.46Å, 8C $_{\beta}$ - 4.31Å. Dla struktury meso-hematyny są to strefy czterech atomów azotu - 4N i czterech atomów węgla - 4C $_{meso}$, gdzie wartości dopasowania są większe o odpowiednio: 0.013Å, 0.02Å oraz przede wszystkim odległość dla tlenu w płaszczyźnie osiowej większa o 0.23Å. Natomiast dla β -hematyny dopasowana wartość dla osiowego atomu tlenu jest taka jak wartość

wyznaczona krystalograficznie, ale większa jest dopasowana wartość odległości dla atomów azotu o $0.01\text{\AA}$ i mniejsza jest odległość bardziej oddalonej od atomu Fe strefy ośmiu atomów węgla $8C_\beta$ od średniej wyznaczonej przez dane krystalograficzne o $0.07\text{\AA}$. O jedną trzecią wyższy współczynnik Debya-Wallera uzyskano dla najbliższego do żelaza atomu tlenu w strukturze meso-hematyny niż β -hematyny. A dla struktury z pojedynczym pierścieniem ferriprotoporfiryny IX w cząsteczce (hematyna) ten sam parametr jest już 2.6 raza większy od współczynnika dla β -hematyny. Około dwukrotnie większe dla hematyny jest nieuporządkowanie w strefie ośmiu węgli typu C_α w stosunku do związków o dimerowej cząsteczce, a więcej niż dwukrotnie dla wartości nieuporządkowania w strefie czterech węgli typu C_{meso} . Wysokie wartości dopasowanych współczynników Debya-Wallera hematyny wskazują zatem na większe cząsteczkowe zróżnicowanie związku o molekułę złożonej z pojedynczego pierścienia protoporfiryny IX ze względu na osiowy atom tlenu i grupę węgli C_α i C_{meso} , bądź też na asymetrię położenia dwóch ostatnich grup węgli w pierścieniu PPIX. Największą jednorodność struktury cząsteczek i zgodność z zaproponowanym początkowym modelem uzyskano dla dopasowania widma EXAFS β -hematyny.

Do dalszej modyfikacji modelowych, wejściowych jednostek strukturalnych tak, by teoretyczne widmo EXAFS na ich podstawie policzone, było jak najbardziej zbliżone do widma eksperymentalnego zastosowano drugą strategię dopasowania. Początkowe wartości kątowych współrzędnych w układzie radialnym przyjęte zarówno dla meso-hematyny, β -hematyny, oraz hematyny są przedstawione w tab. 5.3. Są one obliczone na podstawie wejściowych danych krystalograficznych dla β -hematyny, i nie różnią się od wartości kątowych współrzędnych dla meso-hematyny.

	meso-hematyna β -hematyna hematyna
TH_{O_1}	56.9
TH_{N_1}	140.6
TH_{N_2}	129.5
TH_{N_3}	66.0
TH_{N_4}	57.1
PHI_{O_1}	75.8
PHI_{N_1}	150.3
PHI_{N_2}	353.6
PHI_{N_3}	199.2
PHI_{N_4}	303.1

Tabela 5.3. Kątowe współrzędne w układzie radialnym ułożenia najbliższych do Fe atomów tlenu i czterech atomów azotu w strukturze modelu wejściowego, obliczone na podstawie danych krystalograficznych. W początku układu radialnego umieszczono atom żelaza.

Wyniki dopasowania wraz z przedziałem niepewności dla badanych widm trzech związków przedstawiono w zestawieniu kolejnym, tab. 5.4. Porównując wartości jakości dopasowania R według strategii drugiej w stosunku do ich wartości jakości dopasowania według strategii pierwszej zauważono, że poprawia się on o 0.19 dla

meso-hematyny i o 0.3 dla hematyny, natomiast pogarsza o 0.28 dla β -hematyny. Wartości FI są identyczne jak w poprzednim dopasowaniu dla każdego z rozpatrywanych widm.

	meso-hematyna	β -hematyna	hematyna
R	28.15	39.13	30.52
FI	0.00007	0.00012	0.00008
EF	-3.6 ± 0.4	-3.6 ± 0.7	-3.9 ± 0.5
$r(\text{Fe-N}_{1234})$	2.074 ± 0.003	2.071 ± 0.002	2.064 ± 0.003
TH_{N_1}	140.3 ± 19	140.4 ± 1	141.1 ± 14
TH_{N_2}	129.7 ± 15	127.5 ± 6	125.8 ± 6
TH_{N_3}	66.6 ± 1	63.7 ± 12	63.1 ± 10
TH_{N_4}	53.4 ± 6	55.2 ± 18	55.9 ± 1
PHI_{N_1}	152.7 ± 16	161.8 ± 10	166.4 ± 12
PHI_{N_2}	355.9 ± 8	354.3 ± 21	353.8 ± 22
PHI_{N_3}	197.9 ± 12	198.6 ± 16	203.9 ± 4
PHI_{N_4}	304.1 ± 10	303.0 ± 1	302.7 ± 1

Tabela 5.4. Parametry ułożenia najbliższych do absorbującego Fe czterech atomów azotu po dopasowaniu dla poszczególnych związków. Dopasowanie według strategii drugiej.

Zmiany położenia względem siebie oraz względem płaszczyzny pierścienia proporfiryny IX płaszczyzn wyszczególnionych grup przy jednocześnie tej samej odległości od centralnego żelaza pozycji dopasowywanych atomów azotu miały na celu sprawdzenie spowodowanych przez nie zmian w czynnikach jakości dopasowania. Należy zwrócić uwagę na dosyć wysokie wartości niepewności dopasowania dla kątów przekraczające w niektórych wypadkach 20 stopni. W przedstawionym zestawieniu można zauważyć pewne modyfikacje płaszczyzny pierścienia przede wszystkim przez zmianę kątów θ w stosunku do modelu krystalograficznego. Zmiana katowego położenia jednego z atomów azotu w płaszczyźnie pierścienia meso-hematyny wynosi 4 stopnie, dla β -hematyny 2 stopnie dla dwóch atomów azotu, a dla hematyny po jednym stopniu dla wszystkich czterech atomów azotu. Nie zauważono, aby taka modyfikacja płaszczyzny wprowadziła istotne zmiany w odległości atomów azotu od atomu absorbującego w stosunku do wejściowej struktury. Zarówno parametr dopasowania odległości jak i wartości przesunięcia energetycznego EF mieszczą się w przedziałach niepewności określonych przy dopasowaniu według strategii pierwszej. Ze względu na to, oraz na duży zakres niepewności określenia współrzędnych katowych radialnych zawierający wartości określone przez dane krystalograficzne zdecydowano się pozostać przy wartościach krystalograficznych. Przyjmując za podstawę model struktury po dopasowaniu przy pomocy strategii pierwszej przeprowadzono kolejną procedurę dopasowania według strategii trzeciej, tab. 5.5.

Tym razem dopasowywano wartości katowe dla atomu osiowego tlenu, oraz sprawdzono możliwość odchylenia pozycji centralnego atomu żelaza od centralnej pozycji w obranym układzie. Katowa pozycja atomu tlenu uległa niewielkiej dwu lub jednostopniowej modyfikacji w zależności od związku w stosunku do pozycji

	meso-hematyna	β -hematyna	hematyna
R	28.28	39.14	30.76
FI	0.00007	0.00012	0.00008
EF	-3.4 $\pm$ 0.4	-3.5 $\pm$ 0.6	-4.1 $\pm$ 0.4
Fe _{x0}	-0.005 $\pm$ 0.014	-0.003 $\pm$ 0.025	0.004 $\pm$ 0.012
Fe _{y0}	0.002 $\pm$ 0.007	0.005 $\pm$ 0.007	0.004 $\pm$ 0.012
Fe _{z0}	-0.002 $\pm$ 0.009	-0.004 $\pm$ 0.010	-0.0006 $\pm$ 0.008
r(Fe-O ₁)	1.893 $\pm$ 0.005	1.88 $\pm$ 0.02	1.856 $\pm$ 0.008
r(Fe-N ₁₂₃₄)	2.07 $\pm$ 0.01	2.071 $\pm$ 0.005	2.06 $\pm$ 0.02
TH _{O₁}	60.4 $\pm$ 126	55.5 $\pm$ 248	57.3 $\pm$ 74
PHI _{O₁}	73.2 $\pm$ 11	75.5 $\pm$ 14	76.0 $\pm$ 12

Tabela 5.5. Parametry ułożenia najbliższych do Fe atomu tlenu i czterech atomów azotu, oraz pozycji centralnego atomu żelaza po dopasowaniu dla poszczególnych związków mikrokrystalicznych. Dopasowanie według strategii trzeciej.

wyznaczonych krystalograficznie w układzie radialnym. Jednakże jej niepewność określenia jest tak wysoka, że postanowiono tych zmian nie brać pod uwagę. Stąd wniosek, że EXAFS nie jest czuły na zmianę kątów poszczególnych atomów poza płaszczyznowych. Wydaje się, że atom Fe w pozycji początkowej układu powinien tam pozostawać, ponieważ wartości przesunięcia w kierunkach x,y i z które zostały dopasowane są bardzo niewielkie. Wartości te są obarczone błędem porównywalnym z niepewnościami ustalenia odległości od atomu żelaza dla czterech atomów azotu i atomu tlenu. Brak istotnych zmian czynnika dopasowania R dla poszczególnych związków po zastosowaniu opisanej strategii w stosunku do wartości jakości dopasowania uzyskanych dla dopasowań według strategii drugiej.

Kolejnym krokiem było dopasowanie położenia wszystkich azotów oddzielnie plus osiowego tlenu z uwzględnieniem modyfikacji czynnika Debya-Wallera, tab. 5.6.

	meso-hematyna	β -hematyna	hematyna
R	27.99	39.02	30.60
FI	0.00007	0.00012	0.00008
EF	-3.4 $\pm$ 0.4	-3.5 $\pm$ 0.6	-4.3 $\pm$ 0.4
r(Fe-O ₁)	1.90 $\pm$ 0.02	1.88 $\pm$ 0.01	1.85 $\pm$ 0.01
r(Fe-N ₁)	2.059 $\pm$ 0.006	2.062 $\pm$ 0.009	2.057 $\pm$ 0.008
r(Fe-N ₂)	2.065 $\pm$ 0.006	2.065 $\pm$ 0.008	2.060 $\pm$ 0.006
r(Fe-N ₃)	2.077 $\pm$ 0.007	2.069 $\pm$ 0.009	2.067 $\pm$ 0.006
r(Fe-N ₄)	2.089 $\pm$ 0.006	2.085 $\pm$ 0.009	2.072 $\pm$ 0.006
2 σ^2 (O ₁)	0.012 $\pm$ 0.003	0.008 $\pm$ 0.002	0.027 $\pm$ 0.006
2 σ^2 (4N)	0.0073 $\pm$ 0.0007	0.005 $\pm$ 0.001	0.009 $\pm$ 0.003
2 σ^2 (8C _{α})	0.007 $\pm$ 0.001	0.0052 $\pm$ 0.0009	0.010 $\pm$ 0.003
2 σ^2 (4C _{meso})	0.009 $\pm$ 0.003	0.006 $\pm$ 0.002	0.016 $\pm$ 0.005
2 σ^2 (8C _{β})	0.021 $\pm$ 0.006	0.024 $\pm$ 0.006	0.024 $\pm$ 0.010

Tabela 5.6. Parametry ułożenia najbliższych do Fe atomu tlenu i czterech atomów azotu wraz z czynnikami Debya-Wallera dla wszystkich atomów po dopasowaniu dla poszczególnych związków. Dopasowanie według strategii czwartej.

Po zastosowaniu tej strategii zwiększyła się wartość czynnika Debya-Wallera

dla atomu tlenu o 0.006 dla hematyny. Zarysowuje się tendencja dla wszystkich trzech dopasowywanych struktur do asymetrii w odległościach atomów azotu do tej pory dopasowywanych tak samo najbardziej widoczna dla meso-hematyny. To daje podstawę do sprawdzenia według strategii piątej czy założenie pewnego rodzaju asymetrycznej struktury, również w położeniach atomów węgla, da lepsze czynniki dopasowania R i FI, tab. 5.7.

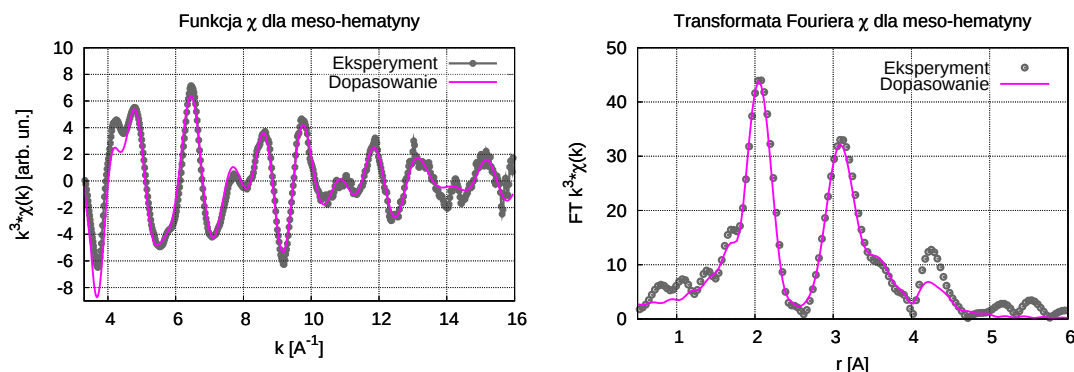
	meso-hematyna		β -hematyna		hematyna	
R	27.85		39.07		31.17	
FI	0.00007		0.00012		0.00007	
EF	-3.3 ± 0.7		-3.4 ± 1.0		-4.0 ± 0.6	
X	r(Fe-X) [Å]	$2\sigma^2$	r(Fe-X) [Å]	$2\sigma^2$	r(Fe-X) [Å]	$2\sigma^2$
O os.	1.90 ± 0.02	0.012 ± 0.002	1.88 ± 0.01	0.007 ± 0.002	1.85 ± 0.01	0.011 ± 0.003 $N=0.52 \pm 0.04$
N₁	2.058 ± 0.009	0.0073 ± 0.0005	2.06 ± 0.01	0.0054 ± 0.0006	2.05 ± 0.01	0.009 ± 0.002
N₂	2.065 ± 0.009	0.0073 ± 0.0005	2.06 ± 0.01	0.0054 ± 0.0006	2.06 ± 0.01	0.009 ± 0.002
N₃	2.077 ± 0.009	0.0073 ± 0.0005	2.08 ± 0.01	0.0054 ± 0.0006	2.07 ± 0.01	0.009 ± 0.002
N₄	2.088 ± 0.009	0.0073 ± 0.0005	2.08 ± 0.01	0.0054 ± 0.0006	2.07 ± 0.01	0.009 ± 0.002
4z8C_{α}	3.088 ± 0.007	0.007 ± 0.001	3.090 ± 0.009	0.005 ± 0.002	3.084 ± 0.006	0.011 ± 0.001
4z8C_{α}	3.095 ± 0.007	0.007 ± 0.001	3.098 ± 0.009	0.005 ± 0.002	3.088 ± 0.007	0.011 ± 0.001
4C_{meso}	3.46 ± 0.01	0.009 ± 0.002	3.46 ± 0.01	0.006 ± 0.003	3.44 ± 0.02	0.015 ± 0.004
4z8C_{β}	4.27 ± 0.03	0.021 ± 0.006	4.25 ± 0.05	0.024 ± 0.011	4.23 ± 0.04	0.024 ± 0.009
4z8C_{β}	4.30 ± 0.04	0.021 ± 0.006	4.30 ± 0.06	0.024 ± 0.011	4.25 ± 0.04	0.024 ± 0.009
C₁ p.p.	3.06 ± 0.07	0.007 ± 0.001	3.02 ± 0.11	0.005 ± 0.002		
C₂ p.p.	3.72 ± 0.07	0.010 ± 0.006	3.67 ± 0.12	0.011 ± 0.011		
O p.p.	4.05 ± 0.03	0.010 ± 0.006	4.07 ± 0.06	0.011 ± 0.011		

Tabela 5.7. Parametry dopasowania dla wszystkich atomów w strukturze wraz z czynnikami Debya-Wallera dla określonych grup atomów. Dopasowanie według strategii piątej. Dopasowanie hematyny według zmodyfikowanej strategii piątej (dodatkowy parametr liczby koordynacyjnej dla osiowego atomu tlenu).

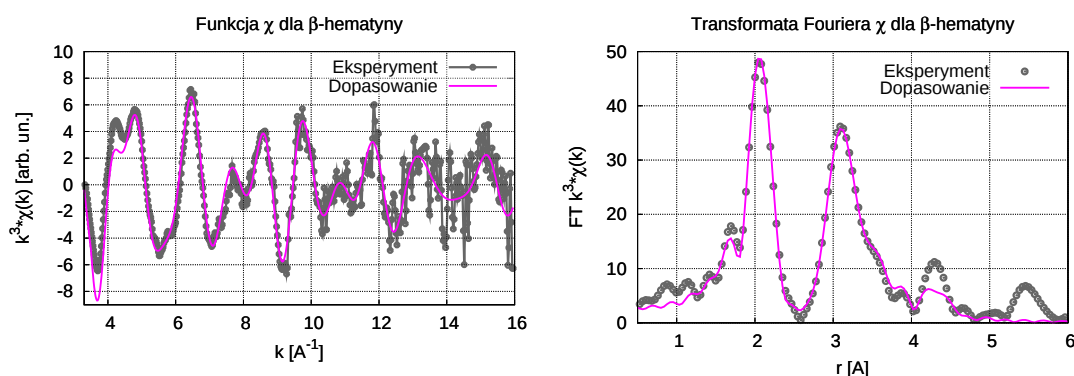
Tylko dla struktury hematyny pojawia się zmiana czynnika FI przy jednoczesnym wzroście czynnika R. Natomiast czynnik R dla meso-hematyny nieznacznie maleje a dla β -hematyny nieznacznie wzrasta. Wprowadzenie podziału na dwie grupy dla atomów węgla typu C _{α} i C _{β} pozwala na dopasowanie nieco innych wartości parametrów odległości w każdej z grup danego typu dla widma każdego związku. Jednak zarówno dla meso-hematyny, β -hematyny i hematyny przedział niepewności dopasowanej odległości w jednej grupie zawiera wartość dopasowanej odległości drugiej grupy danego typu. Obowiązuje to zarówno dla węgla typu C _{α} jak i C _{β} . Natomiast rozpiętość wartości dopasowania odległości w grupie czterech azotów jest większa niż wyznaczona podczas dopasowania niepewność. Dla meso-hematyny wynosi ona 0.03Å, dla β -hematyny i hematyny 0.02Å. Parametry wyznaczone dla odległości poszczególnych atomów, bądź ich grup dla meso-hematyny są bliższe parametrom wyznaczonym z dopasowania dla β -hematyny niż hematyny. Jest tak dla czterech atomów azotu, atomów węgla typu C _{α} , C_{meso} C _{β} . Przedział niepewności z jakim została wyznaczona dla meso-hematyny odległość żelazo-tlen osiowy zawiera wartość dopasowania odległości tego atomu w strukturze β -hematyny, ale nie zawiera wartości tej odległości dla hematyny, ani też wartości 1.66Å, która została wyznaczona z danych krystalograficznych. Podobna sytuacja występuje dla jednej z podgrup węgla typu C _{β} . W granicach błędu wartości odległości odpowiadających sobie atomów należących do wiązania mostka tlenowego dla struktury β -hematyny i meso-hematyny oznaczonych jako p.p. są nierozróżnialne. Również różnica pomiędzy dopasowanymi czynnikami Debya-Wallera jest

mniejsza dla pary meso-hematyna - β -hematyna niż pary meso-hematyna - hematyna dla węgla typu C_α i C_{meso} a zbliżona dla strefy atomów azotu. Największe wartości czynnika Debya-Wallera dla każdej ze stref zostały wyznaczone dla struktury hematyny. Tak jak w dopasowaniach według poprzednich strategii, dokonując dopasowania według wytyczonych reguł w strategii piątej, uzyskano dużą wartość nieuporządkowania strukturalnego dla osiowego atomu tlenu - 0.029 w strukturze związku o cząsteczce złożonej z pojedynczej cząsteczki FePPIX - hematynie w porównaniu do związków o cząsteczce dimerowej, odpowiednio 0.007 i 0.012 dla dopasowania widma β -hematyny i meso-hematyny. Zmieniono zatem strategię dopasowania dla atomu osiowego tlenu w modelu hematyny wprowadzając dodatkowy parametr - liczbę koordynacyjną N dla tego atomu. Okazało się, że centralny atom żelaza posiada ligand tlenowy statystycznie w co drugiej cząsteczce ($N=0.52\pm0.04$) o wartości nieuporządkowania strukturalnego podobnego jak w strukturze meso-hematyny. Według wzoru strukturalnego hematyny (za katalogiem Alfa Aesar) ligandem żelaza w tym związku jest grupa -OH (w modelu strukturalnym dla potrzeb EXAFS i ze względu na czułość metody nie uwzględniono atomu wodoru). Jest to grupa silnie reaktywna i mogąca podlegać wymianie na inną grupę -OH a także na O_2 czy H_2O . Hematyna nie była przechowywana w specjalnych warunkach bezwodnych czy beztlenowych stąd mógł zachodzić opisany proces wymiany. Proces ten uwidocznił się podczas analizy EXAFS w parametrach wyznaczających liczbę koordynacyjną i nieuporządkowanie strukturalne. Parametry te są ze sobą skorelowane. Próbkę przed pomiarem została szybko schłodzona a w czasie pomiaru miała temperaturę zbliżoną do temperatury ciekłego helu, zatem podczas pomiaru nie zachodziła wymiana ligandu. Widmo EXAFS rejestruje jednak uśredniony sygnał pochodzący od wielu atomów żelaza w pierścieniu PPIX, które w chwili tuż przed zmrożeniem albo posiadały ligand, albo nie posiadały ligandu. W dalszej części analizy, w szczególności widm EXAFS dotyczących roztworów wartość liczby koordynacyjnej dla osiowego atomu tlenu mniejsza od 0.5 będzie świadczyć o niestabilnym wiązaniu tego atomu z centralnym atomem żelaza. Graficzne przedstawienie dopasowania według strategii piątej widm EXAFS dla meso-hematyny, β -hematyny i według zmodyfikowanej strategii piątej dla hematyny przedstawiono odpowiednio na rys. 5.7, rys. 5.8 i rys. 5.9. Porównując dopasowania dla meso-hematyny i β -hematyny widoczne jest, że funkcja dopasowana dla pierwszego związku odtwarza, choć niedokładnie, pik w zakresie $14-14.5\text{\AA}^{-1}$ funkcji $\chi(k)$ natomiast dla β -hematyny funkcja dopasowania nie uwzględnia tej struktury.

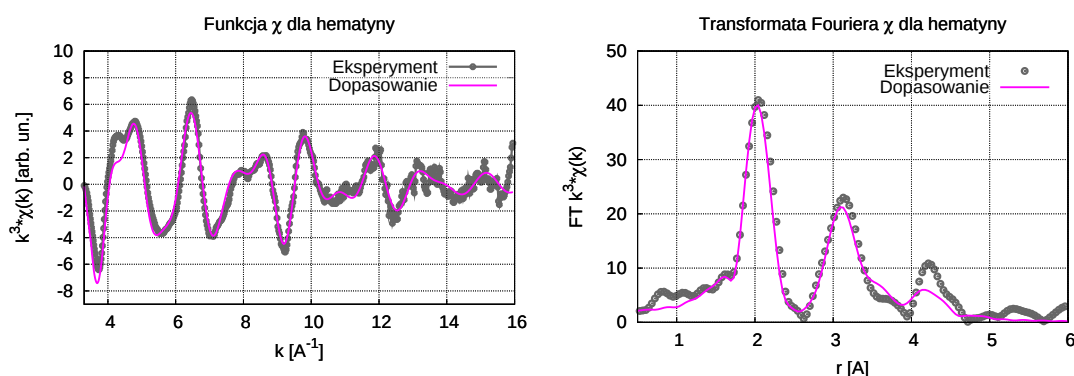
Wnioskiem z analizy widm EXAFS dla meso-hematyny, β -hematyny i hematyny jest to, że struktura meso-hematyny ze względu na odległości poszczególnych atomów oraz parametry uporządkowania strukturalnego jest znacznie bardziej podobna do β -hematyny niż hematyny zatem potwierdzono przynależność tego materiału do grupy związków o cząsteczce złożonej z podwójnego pierścienia FePPIX z tlenowym wiązaniem mostkowym.



Rysunek 5.7. Funkcja $\chi(k)$ EXAFS wraz z funkcją dopasowania dla meso-hematyny, oraz ich transformaty Fouriera.



Rysunek 5.8. Funkcja $\chi(k)$ EXAFS wraz z funkcją dopasowania dla β -hematyny, oraz ich transformaty Fouriera.



Rysunek 5.9. Funkcja $\chi(k)$ EXAFS wraz z funkcją dopasowania dla hematyny, oraz ich transformaty Fouriera.

• **Struktura β -hematyny w zestawieniu ze strukturą dla hemozoiny - naturalnego produktu pasożyta malarii.**

W zestawieniu w tab. 5.8 przedstawiono wyniki dopasowania struktury hemozoiny i β -hematyny pochodzące z artykułu autora rozprawy [76]. Widma pochodzą z innej serii pomiarowej i innego układu doświadczalnego (stacja A1, Hasylab w

Hamburgu) niż widma dla meso-hematyny, β -hematyny i hemozoiny omównione powyżej. Opisana w artykule próbka β -hematyny nie jest dokładnie tą samą próbką β -hematyny omówioną w porównaniu z meso-hematyną powyżej, choć została zsyntezowana tą samą metodą. Dla rozróżnienia próbka β -hematyny opisana w artykule będzie odtąd oznaczona jako β -hematyna*. Ze względu na pomiar na innym układzie doświadczalnym przy porównaniu struktury meso-hematyny i β -hematyny ze strukturą hemozoiny i β -hematyny* należy brać pod uwagę możliwość wystąpienia różnic ze względu na błąd systematyczny. Procedura samego dopasowania widm EXAFS dla hemozoiny i β -hematyny* była inna niż dla meso-hematyny i β -hematyny. Dopasowywano parametry odległości i uporządkowania strukturalnego dla strefy osiowego atomu tlenu, strefy czterech atomów azotu oraz strefy węgla typu C_α - w tab. 5.8 są to C_1 do C_8 , oraz typu C_{meso} - w tab. 5.8 są to C_9 do C_{12} , z tym że parametry odległości oddzielnie dla każdego z atomów, natomiast czynniki Debye-Wallera te same dla atomów danej strefy.

hemozoina			β -hematyna*	
EF	6.2±0.4		6.6±0.2	
X	r(Fe-X) [Å]	σ^2	r(Fe-X) [Å]	σ^2
O os.	1.89±0.10	0.055±0.023	1.85±0.01	0.004±0.001
N ₁	2.002±0.005	0.006±0.001	2.031±0.003	0.0035±0.0005
N ₂	2.011±0.005	0.006±0.001	2.040±0.003	0.0035±0.0005
N ₃	2.023±0.005	0.006±0.001	2.052±0.003	0.0035±0.0005
N ₄	2.037±0.005	0.006±0.001	2.066±0.003	0.0035±0.0005
C ₁	3.006±0.005	0.005±0.001	3.032±0.005	0.005±0.001
C ₂	3.024±0.005	0.005±0.001	3.050±0.005	0.005±0.001
C ₃	3.026±0.005	0.005±0.001	3.052±0.005	0.005±0.001
C ₄	3.030±0.005	0.005±0.001	3.056±0.005	0.005±0.001
C ₅	3.051±0.005	0.005±0.001	3.077±0.005	0.005±0.001
C ₆	3.056±0.005	0.005±0.001	3.082±0.005	0.005±0.001
C ₇	3.068±0.005	0.005±0.001	3.094±0.005	0.005±0.001
C ₈	3.069±0.005	0.005±0.001	3.095±0.005	0.005±0.001
C ₉	3.425±0.014	0.002±0.002	3.427±0.016	0.013±0.003
C ₁₀	3.445±0.014	0.002±0.002	3.447±0.016	0.013±0.003
C ₁₁	3.447±0.014	0.002±0.002	3.449±0.016	0.013±0.003
C ₁₂	3.453±0.014	0.002±0.002	3.455±0.016	0.013±0.003

Tabela 5.8. Parametry dopasowania β -hematyny i pigmentu malarii hemozoiny przy pomocy strategii dopasowania odległości każdego z atomów oddzielnie. Dane pochodzą z artykułu autora rozprawy [76].

Porównując wyniki dopasowania dla β -hematyny po zastosowaniu strategii piątej, tab. 5.7, z wynikami z opublikowanego artykułu dla β -hematyny*, tab. 5.8 zauważono, że dla najbliższego otoczenia atomu żelaza odległość dla atomu tlenu różni się w obu modelach o 0.03Å i żadna z wartości nie mieści się w niepewności dopasowania drugiej. Natomiast, co do atomów azotu to ich odległości są bardziej zróżnicowane w strukturalnym modelu β -hematyny* (0.035Å różnicy pomiędzy najmniejszą a największą). Dwie spośród czterech wartości odległości atomów azotu w modelu β -hematyny* mieszczą się w zakresie niepewności pomiarowej określonej przy dopasowaniu tych parametrów dla widma β -hematyny po zas-

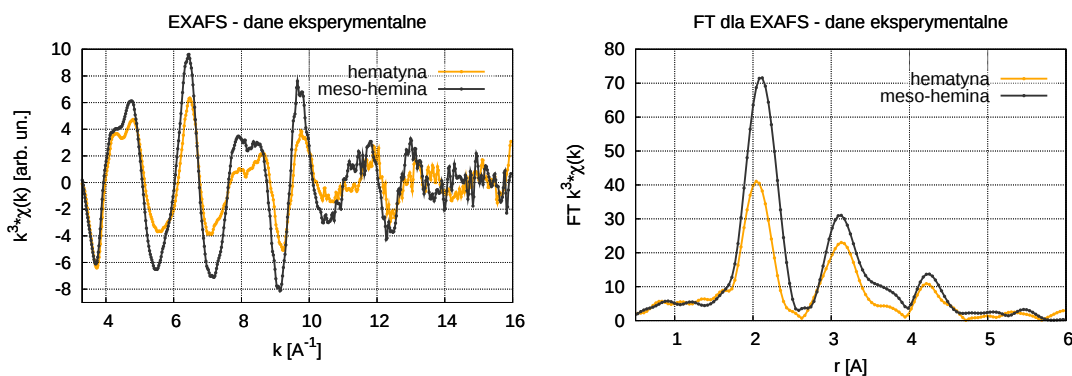
tosowaniu opisanej powyżej strategii piątej, tab. 5.7, a dwie z nich są zdecydowanie mniejsze. Podobnie rzecz ma się dla strefy ośmiu atomów węgla (atomy typu C_α w tab. 5.7, C_1 do C_8 w tab. 5.8). Połowa określonych dla nich wartości odległości w modelu opublikowanym dla β -hematyny* mieści się w zakresie przedziału niepewności dla odległości tych samych atomów w strukturze dla β -hematyny, połowa jest mniejsza. Średnio w opublikowanych danych odległości od absorbera w poszczególnych strefach są mniejsze. To nasuwa przypuszczenie, że mamy do czynienia z błędem systematycznym, w jednym z dopasowań, tym bardziej, że wartość przesunięcia energetycznego widma EXAFS - EF, która jest skorelowana z parametrami odległości dla atomów struktury, jest różna dla dopasowań β -hematyny i β -hematyny*. Możliwe, choć mniej prawdopodobne, jest także to, że struktury β -hematyny i β -hematyny* różnią się, pomimo dokładnie tej samej procedury syntezy obydwu próbek. Jeśli dopasowywane odległości wszystkich atomów modelu umieszczonego w publikacji zwiększy się o $0.02\text{\AA}$ wtedy mieszczą się one w granicach niepewności dopasowania przedstawionego w niniejszej rozprawie dla najbliższego do atomu żelaza atomu tlenu, oraz czterech atomów azotu i węgla typu C_α dla β -hematyny.

Uwzględniając ten błąd systematyczny odległość dla osiowego tlenu w strukturze naturalnego produktu pasożyta hemozoiny wynosi $1.91\text{\AA}$ z bardzo dużą wartością nieuporządkowania strukturalnego $0.05\text{\AA}^2$ świadczącą o znaczącej niejednorodności cząsteczkowej tego materiału biologicznego w porównaniu do syntetycznie wytworzonej β -hematyny $0.007\text{\AA}^2$. Przy porównaniu wartości nieuporządkowania strukturalnego należy pamiętać, że w dopasowaniach publikowanych po raz pierwszy w niniejszej rozprawie wszystkie czynniki Debya-Wallera podawane są jako $2\sigma^2$ (meso-hematyna, β -hematyna, hematyna, meso-hemina, oraz roztwory meso-hematyny), natomiast czynniki Debya-Wallera dla danych pochodzących z artykułu (hemozoina, β -hematyna*), są wyrażone jako σ^2 , [76].

Do wyników zawartych w publikacji autora rozprawy, w szczególności do wartości długości wiązania Fe-O w hemozoinie i nieuporządkowania strukturalnego dla osiowego atomu tlenu w tym związku odnosi się T. Egan [77]. Zauważa on, że długość Fe-O według autora rozprawy jest większa w hemozoinie niż β -hematynie, gdy tymczasem badania z wykorzystaniem rentgenowskiej metody dyfrakcyjnej przeprowadzone na hemozoinie nie pochodzącej z organizmu ludzkiego pozwoliły na wyznaczenie długości wiązania żelazo-tlen osiowy jako $1.82\text{\AA}$ a zatem krótszej niż w β -hematynie, [78]. T. Egan wskazuje na wpływ hydratacji na budowę związku jako prawdopodobną przyczynę różnic, [79]. **Ze względu na duży błąd wyznaczenia odległości żelazo-tlen osiowy, jak również wartości nieuporządkowania dla osiowego tlenu w strukturze hemozoiny, tab. 5.8, można uznać, że materiał wykorzystany do badań miał bardzo niejednorodną budowę. Dlatego zakwalifikowanie meso-hematyny jako związku dimerowego przeprowadzono przez porównanie wyników analizy rentgenowskiej absorpcji uzyskanych dla tego materiału z wynikami uzyskanymi dla β -hematyny, powszechnie uznanej jako związek mający tę samą strukturę co hemozoina, [37].**

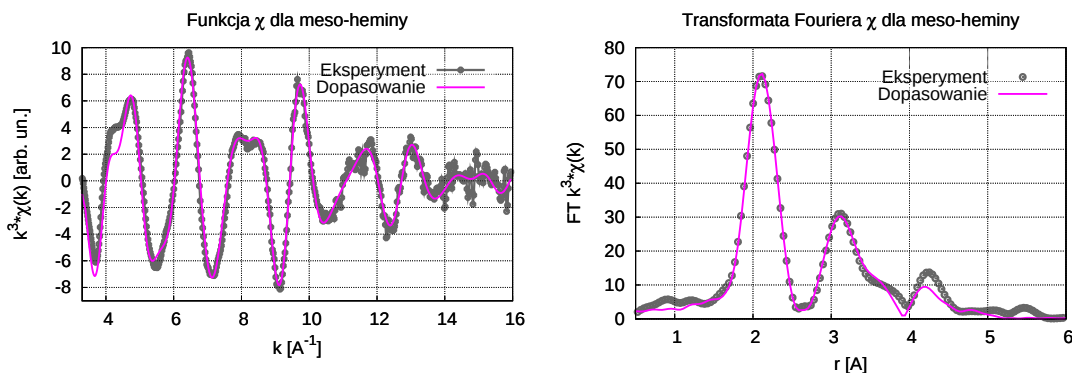
• Struktura meso-heminy.

Ponieważ w dyskusji wyników analizy widm dla meso-hematyny rozpuszczonej w organicznych rozpuszczalnikach niezbędna będzie znajomość odległości w jakiej może się znaleźć atom chloru przeprowadzono analizę EXAFS meso-heminy - związku, który jako atom osiowy do pierścienia FePPIX zamiast tlenu, tak jak to ma miejsce w hematinie, posiada atom chloru. Służy on jako produkt podstawowy do wytworzenia meso-hematyny. Porównanie widm EXAFS dla obu związków o cząsteczce zbudowanej z pojedynczego pierścienia FePPIX czyli hematyny i meso-heminy przedstawiono na rys. 5.10. Różnice w funkcji $\chi(k)$ są wyraźne w całym zakresie a transformata dla meso-heminy posiada niemal dwukrotnie większą amplitudę pierwszego pików o maksimum dla 2.01Å.



Rysunek 5.10. Porównanie eksperymentalnych widm EXAFS hematyny i meso-heminy oraz ich transformat Fouriera.

Parametry dopasowania jednostki strukturalnej dla cząsteczki z pojedynczym FePPIX i z atomem chloru w miejsce atomu tlenu według strategii piątej przedstawiono w tab. 5.9 a eksperymentalna funkcje $\chi(k)$ w zestawieniu z funkcją dopasowaną na rys. 5.11.



Rysunek 5.11. Funkcja eksperymentalna $\chi(k)$ z funkcją dopasowania oraz transformatą Fouriera obu dla meso-heminy

Podobnie jak dla dopasowań meso-hematyny, β -hematyny i hematyny w obydwu grupach węgla typu C_α i C_β wartości parametrów odległości od absorbera

meso-hemina		
R	20.50	
FI	0.00003	
EF	-4.1 ± 0.6	
X	r(Fe-X) [Å]	$2\sigma^2$
Cl os.	2.256 ± 0.005	0.005 ± 0.001
N₁	2.05 ± 0.02	0.006 ± 0.002
N₂	2.06 ± 0.02	0.006 ± 0.002
N₃	2.08 ± 0.02	0.006 ± 0.002
N₄	2.12 ± 0.02	0.006 ± 0.002
4z8C_α	3.09 ± 0.04	0.007 ± 0.002
4z8C_α	3.10 ± 0.04	0.007 ± 0.002
4C_{meso}	3.46 ± 0.02	0.008 ± 0.002
4z8C_β	4.31 ± 0.04	0.013 ± 0.004
4z8C_β	4.31 ± 0.04	0.013 ± 0.004

Tabela 5.9. Parametry dopasowania odległości i czynników Debya-Wallera dla meso-heminy w zastosowaniu strategii piątej.

odpowiednio pozostają w granicy błędu albo nie różnią się. Różnica w odległościach dla atomów azotu w skrajnym przypadku wynosi 0.06 Å i przewyższa błąd dopasowania tego parametru trzykrotnie. Parametry jakości dopasowania $R=20.50$ i $Fi=0.00003$ są najlepsze ze wszystkich dopasowań dla materiałów w postaci proszkowej przedstawionych w niniejszej pracy. Odległości atomu chloru od absorbującego centrum wyznaczono na $2.256 \pm 0.005 \text{ Å}$ z parametrem nieuporządkowania strukturalnego sugerującym wysoką jednorodność budowy cząsteczek meso-heminy.

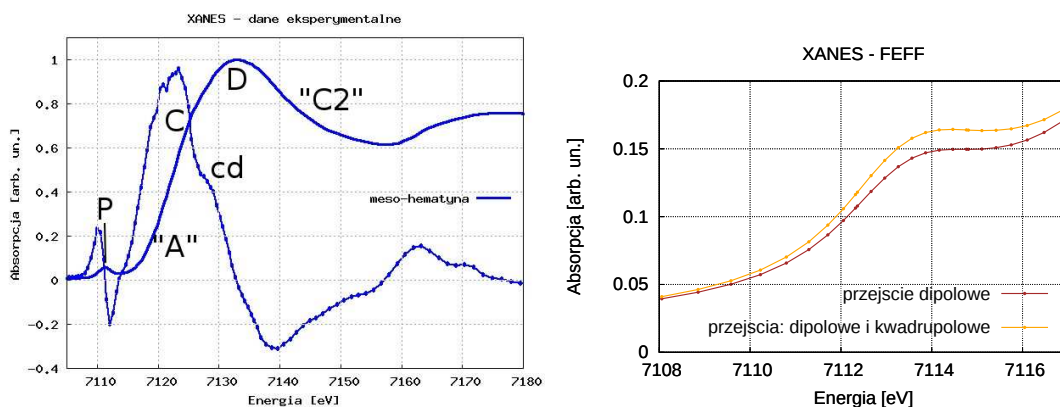
• • •

Przeprowadzone strategie dopasowania i ich rezultaty są wskazówką do przyjęcia strategii dopasowania meso-hematyny w roztworach. Zrezygnowano mianowicie z dopasowania jakichkolwiek parametrów kątowych oraz podziału grup węgla typu C_α i C_β na grupy. Niemożność znalezienia dokładnego położenia kątowego w trójwymiarowej przestrzeni dla atomów pozapierścieniowych przez dopasowanie EXAFS daje pewną dowolność dla wybrania położenia dodatkowych atomów znajdujących w modelach strukturalnych otoczenia atomu żelaza w roztworach.

5.1.2 Analiza widm XANES

Uzupełnieniem analizy EXAFS są wyniki analizy XANES. Rys. 5.12 po lewej przedstawia XANES meso-hematyny i jego pochodną z zaznaczeniem charakterystycznych dla związków na bazie FePIX struktur widma. Oznaczenia wprowadzono za A. Boffi i in. [80]. W widmie meso-hematyny obecna jest przedkrawędziowa struktura P często oznaczona w literaturze jako struktura dla przejścia $1s-3d$ [81, 82, 83], oraz struktura C i D przypisywane procesom rezonansowego wielokrotnego rozpraszania (multiple scattering resonances) [84, 85]. Na zmiany kształtu i położenia energetycznego P wpływ mają zmiany spinu i zmiany

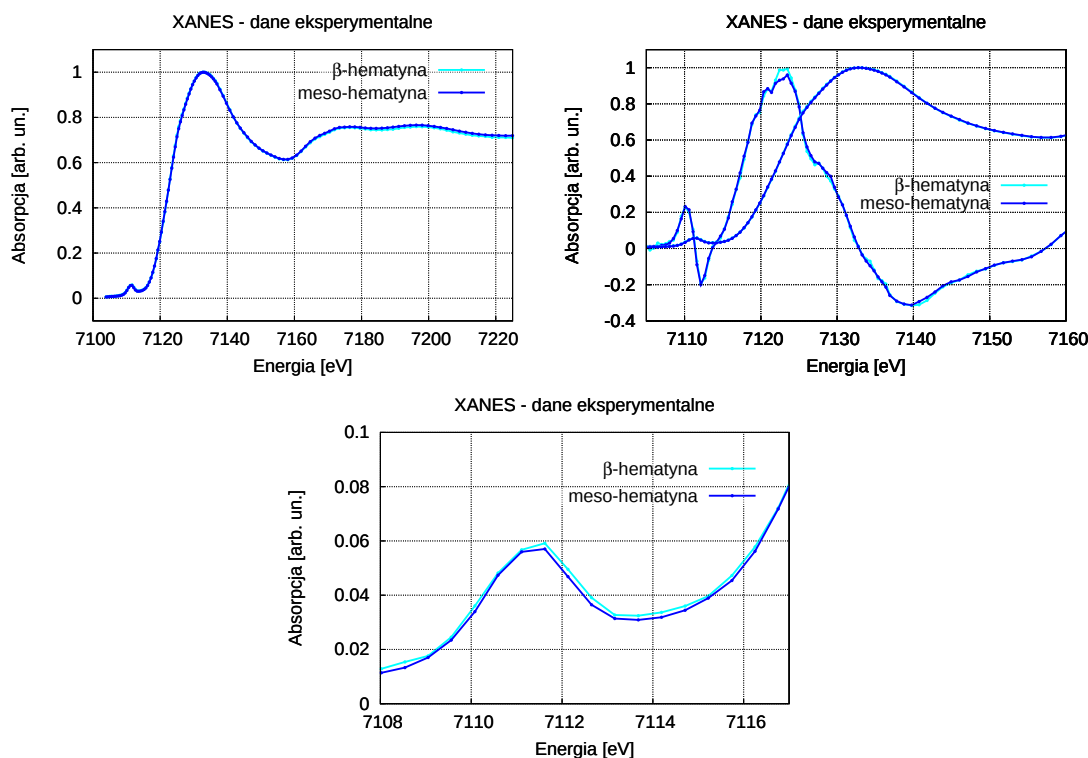
strukturalnej symetrii, lub odchylenie od wcześniejszej symetrii wokół atomu żelaza, natomiast za zmiany C i D odpowiadają głównie zmiany strukturalne wokół centralnego absorbera uwzględniające nie tylko strefę czterech atomów azotów i odpowiednich atomów osiowych, lecz również strefy węgla typu C_α i C_{meso} , [86]. Zmiany te obejmują nie tylko odległości atomu lub grupy atomów, ale też ich katowe położenia, jak np. względne położenie płaszczyzn pierścieni pirolowych. Struktura P w symetrii dla porfiryiny odzwierciedla istnienie stanów shybrydyzowanych i jest wynikiem przejścia elektronu ze stanu 1s do shybrydyzowanego z orbitalem 3d orbitalu typu 4p, [87, 88]. Prawdopodobieństwo wystąpienia tego zjawiska, a zatem amplituda struktury P w stosunku do wzrostu głównej krawędzi absorpcji silnie zależy od symetrii układu. Dla idealnego pierścienia FePPIX z ligandem, o symetrii C_{4v} , następuje hybrydyzacja orbitali 3d i 4p w orbitalach typu a_1 i znacząco mniej w e. [89]. Konieczne okazało się uwzględnienie przejść kwadrupolowych, co sprawdzono za pomocą programu FEFF, używając karty MULTIPOLE. Na rys. 5.12 po prawej przedstawiono widmo XANES w zakresie energetycznym dla struktury P policzone dla przejść wyłącznie dipolowych i przejść dipolowych z kwadrupolowymi dla modelu struktury meso-hematyny uzyskanej po dopasowaniu EXAFS. Różnica jest nie do pominięcia, dlatego w późniejszych obliczeniach teoretycznych funkcji XANES uwzględniano przejścia zarówno dipolowe jak i kwadrupolowe.



Rysunek 5.12. Po lewej eksperymentalne widmo XANES i jego pochodna dla meso-hematyny z zaznaczonymi miejscami pojawiania się charakterystycznych struktur dla widma porfiryń z centralnym atomem żelaza i osiowymi ligandami. Duże litery odnoszą się do widma XANES a małe do jego pochodnej. Cudzysłów oznacza że dana struktura w danym widmie nie występuje, lub jest bardzo słabo zarysowana. Po prawej za pomocą FEFF policzono wkład do przedkrawędziowej struktury P od przejścia dipolowego, oraz przejścia zarówno dipolowego jak i kwadrupolowego. Jako model wykorzystano jednostkę strukturalną meso-hematyny po dopasowaniu EXAFS.

Na rysunkach rys. 5.13, oraz rys. 5.14 przedstawiono eksperymentalne widma XANES, oraz ich pochodne w zestawieniach odpowiednio dla meso-hematyny z β -hematyną, oraz meso-hematyny z hematyną. Nie odnotowano żadnych różnic w widmie dla obydwu związków o dimerowej, według danych krystalograficznych i analizy EXAFS, strukturze cząsteczki. Na podstawie XANES nie stwierdzono zatem różnic pomiędzy strukturalną symetrią wokół atomu żelaza, spinem, oraz stop-

niem utlenienia (brak przesunięcia głównej krawędzi absorpcji obu widm) atomu żelaza. Charakterystyczna dla XANES meso-hematyny i β -hematyny jest obecność struktury P (7111eV), słabo zarysowanej, ale rozróżnialnej struktury C (7125eV) oraz maksimum (D) w 7133eV. Dla pochodnej widm XANES można wyróżnić charakterystyczne struktury dla energii 7110eV, 7112eV, 7119eV, 7123eV - wartość określająca położenie głównej krawędzi absorpcji, 7129eV, 7136eV.

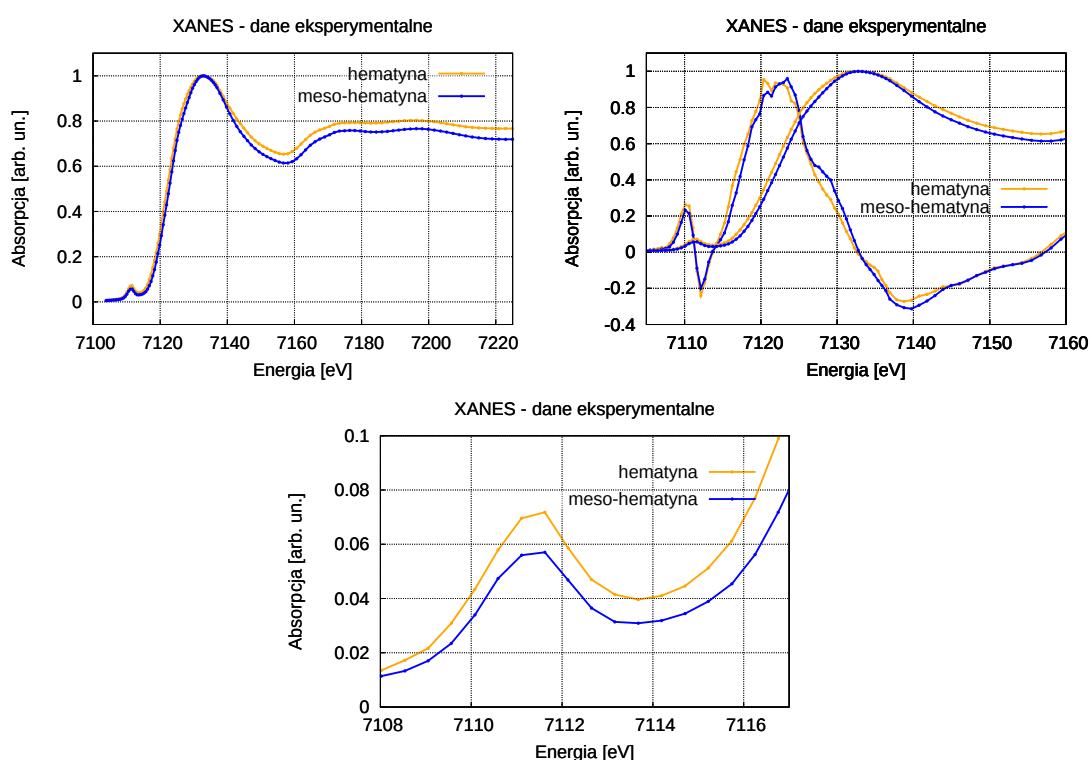


Rysunek 5.13. Dane eksperymentalne XANES oraz ich pochodna dla meso-hematyny w zestawieniu z danymi dla β -hematyny

Różnice XANES zostały zaobserwowane pomiędzy para meso-hematyna - hematyna. Intensywność głównego pik absorpcyjnego jest mniejsza dla hematyny, co najprawdopodobniej ma związek ze zmianami strukturalnymi wokół atomu żelaza. Krawędź absorpcji jest dla meso-hematyny przesunięta o 0.5eV w kierunku wyższych energii, co wskazuje na wyższy stopień utlenienia atomu absorbującego. Rozpoznawalna różnica pomiędzy widmami mieści się w zakresie 7126eV a 7133eV (brak struktury C dla hematyny), co przekłada się na widmo pochodnej w zaniku struktury dla energii 7129eV dla hematyny, oznaczonej na rys. 5.12 jako cd. Zanik struktury C przypisano większej liczbie kolinearnych rozprożeń wielokrotnych [80] co jest równoznaczne z innym położeniem względnym atomów pierścienia FePPIX. Znajduje to potwierdzenie w wynikach analizy EXAFS, które wykazały większy nieporządek strukturalny wszystkich stref węgli i azotów w porównaniu do struktury dimerów. Widmo EXAFS hematyny dopasowywano na podstawie modelu uwzględniającego katowe położenia wzajemne atomów i ich grup takie jak dla jednostki strukturalnej meso-hematyny. Widmo hematyny wykazuje większą amplitudę P - więcej stanów 3d shybrydyzowanych z 4p, co wskazuje na zmianę symetrii wokół absorbującego atomu Fe. Różnice XANES nie wskazują na zmiany

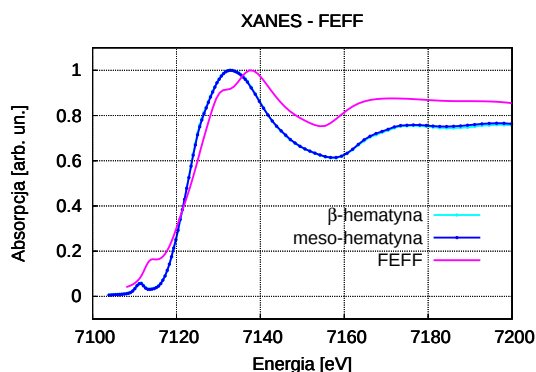
spinu atomu Fe, ponieważ na żadnym z widm nie pojawia się struktura A, ani też duże zmiany stopnia utlenienia absorbera - brak znacznego przesunięcia energetycznej pozycji głównej krawędzi absorpcji. W tym miejscu należy zaznaczyć, że wszelkie wnioski dotyczące wartości spinu atomu żelaza są wyciągane na podstawie podobieństwa i obecności pojawiających się określonych struktur w widmach XANES zamieszczonych w literaturze dla związków o strukturze ferriprotoporfiryny z ligandem atomu lekkiego jak tlen i azot. Pomiary XANES nie były przeprowadzane w polu magnetycznym.

Widma XANES i ich pochodne dla wszystkich rozpatrywanych materiałów proszkowych posiadają podobny kształt, co przedstawione w literaturze widma dla układów wysokospinowych ($S=5/2$) żelazowych związków porfiryńowych [90], co jest zgodne z charakterystyką proszkowej β -hematyny.



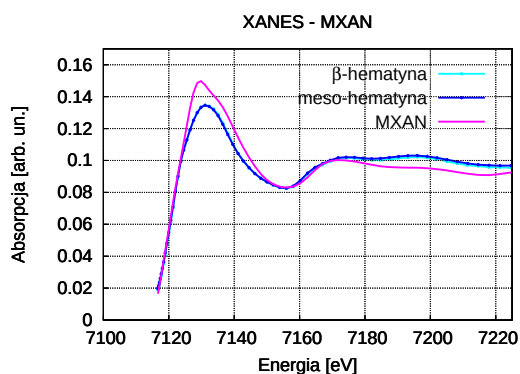
Rysunek 5.14. Dane eksperymentalne XANES oraz ich pochodna dla meso-hematyny w zestawieniu z danymi dla hematyny

Podjęto próbę rekonstrukcji widma XANES wykorzystując jako dane wejściowe pozycje atomów jednostki strukturalnej zmodyfikowanej przez parametry dopasowania EXAFS strategia piąta, tab. 5.7. Rys. 5.15 przedstawia widma XANES meso-hematyny, β -hematyny, oraz widmo teoretyczne XANES policzone programem FEFF na podstawie parametrów jednostki strukturalnej dla cząsteczki dime-rowej zmodyfikowanej przez parametry dopasowania EXAFS przy użyciu strategii piątej dla meso-hematyny. Wszystkie trzy charakterystyczne struktury widma XANES - P,C,D zostały odtworzone z tą różnicą, że zarówno energetyczna pozycja przejścia $1s-3d$ jak i krawędź absorpcji zostały przesunięte w teoretycznym widmie w kierunku wyższych energii i krawędź absorpcji wzrasta wolniej.



Rysunek 5.15. Widma XANES dla meso-hematyny i β -hematyny, oraz policzone przez FEFF teoretyczne widmo XANES na podstawie parametrów dla meso-hematyny po analizie EXAFS, tab. 5.7.

Na Rys. 5.16 pokazano teoretyczne widmo XANES policzone i dopasowane do struktury eksperymentalnego XANES meso-hematyny i β -hematyny. W zestawieniu w tab. 5.10 przedstawione zostały wyniki dopasowania XANES przy użyciu programu MXAN dla eksperymentalnego widma meso-hematyny. Ta metoda nie uwzględnia dopasowania zakresu struktury P, dlatego nie przedstawiono widma poniżej 7114 eV. Ponieważ widmo XANES jest takie samo dla meso-hematyny jak β -hematyny oczekujemy dla tej ostatniej dokładnie tych samych parametrów. Strategia tego dopasowania jest opisana w podrozdziale 4.2. Ponieważ atomy węgla przesuwane były wraz z atomami azotu tak, aby zachowane zostało ich wzajemne położenie w grupach w umieszczonym zestawieniu (tab. 5.10) zostały przedstawione otrzymane odległości jedynie dla atomów azotu i tlenu.



Rysunek 5.16. Widma XANES dla meso-hematyny i β -hematyny na tle policzonego i dopasowanego przez MXAN teoretycznego XANES na podstawie modelu jednostki strukturalnej dla meso-hematyny po analizie EXAFS, tab. 5.7.

Pozycje atomów azotu są zbliżone do tych uzyskanych analizą EXAFS i mieszczą się w przedziale ich niepewności. Natomiast odległości żelazo-tlen osiowy jest krótsza o $0.04\text{\AA}$ od tej uzyskanej podczas analizy EXAFS dla meso-hematyny i o $0.02\text{\AA}$ krótsza od wartości parametru odległości dla dopasowania widma EXAFS β -hematyny.

	meso-hematyna β -hematyna
S^2	0.408
X	$r(\text{Fe-X})$ [Å]
O os.	1.86
N ₁	2.06
N ₂	2.07
N ₃	2.07
N ₄	2.10

Tabela 5.10. Parametry dopasowania XANES dla mesohematyny wyznaczone za pomocą programu MXAN.

Dimerową strukturę cząsteczki meso-hematyny potwierdza identyczność jej widma XANES z widmem uzyskanym dla β -hematyny. Charakterystyczne struktury na widmie XANES obu materiałów zostały odтворzone przez teoretyczne widmo XANES policzone za pomocą FEFF, a dopasowane przez MXAN parametry odległości dla wybranych grup atomów w pierścieniu FePPIX są w zgodzie z analizą EXAFS.

5.2 Struktura cząsteczki substytutu pigmentu malarii w roztworze przed i po reakcji z chlorochiną.

W rozdziale zamieszczono analizę i dyskusję jej wyników dla dopasowań widm EXAFS i XANES przeprowadzonych dla sześciu próbek rozpuszczalnej mesohematyny w roztworze kwasu octowego, oraz dwóch próbek mesohematyny w roztworze dimetylosulfotlenku. Roztwory przed rozpoczęciem pomiaru zmrożono do temperatury 13K.

Celem przeprowadzonego eksperymentu było znalezienie i interpretacja ewentualnych różnic w widmach EXAFS i XANES dla mesohematyny bez i w obecności antymalarycznego leku - chlorochininy w czterech rodzajach rozpuszczalnika: kwasie octowym z różną zawartością wody i dimetylosulfotlenku. Dodatkowym celem analizy było zbadanie wpływu rodzaju rozpuszczalnika na lokalne otoczenie atomowe pierścienia FePPIX.

Absorbujący promieniowanie rentgenowskie o energii 7-8keV atom żelaza nie powinien znajdować się nigdzie indziej niż w cząsteczkach pierścieni FePPIX rozpuszczonej meso-hematyny. Żadna z cząsteczek składników zastosowanych rozpuszczalników nie zawiera nominalnie atomów żelaza. Dlatego poszukiwanym otoczeniem tego atomu pozostaje pierścieni PPIX wraz z atomami tlenowego wiązania mostkowego.

Pierwsze doniesienie o tworzeniu się kompleksu chlorochininy z cząsteczką porfiryry pojawiło się w 1964 roku [91]. Wciąż jednak brak jednoznacznego określenia struktury takiego związku, ponieważ kompleks nie daje się skryształizować.

Prace nad określeniem charakteru wiązania związków typu chinina z FePPIX były prowadzone za pomocą metod spektroskopowych a przede wszystkim absorpcyjnej spektroskopii w zakresie UV. Metoda ta pozwala na określenie wystąpienia prawdopodobieństwa wiązania w kompleks danych cząsteczek w roztworach o zróżnicowanym składzie i czynniku pH [21, 92]. Metodami spektroskopowymi, które doświadczalnie potwierdzają charakter wiązania składników kompleksu jako wiązanie typu $\pi - \pi$ są NMR [93, 18, 19, 22], oraz spektroskopia Ramana [94]. Modelowanie struktury kompleksu przy pomocy algorytmów poszukujących energetycznego minimum konfiguracji atomów chlorochininy i chininy z FePPIX pozostaje nadal jedyną informacją o jego prawdopodobnej molekularnej budowie [95, 96, 97, 98].

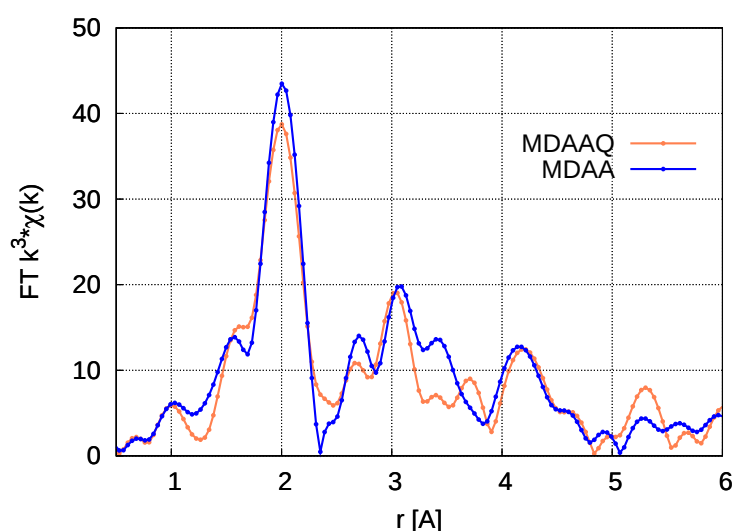
Przedstawienie analizy eksperymentalnych funkcji $\chi(k)$ rozpoczęto od widm rozpuszczonych w kwasie octowym.

5.2.1 Roztwory kwasu octowego

Kwas octowy o cząsteczce CH_3COOH jest cieczą o polarnym charakterze cząsteczek. W rozpuszczalniku AA (z ang. acetic acid) czyli czystym kwasie octowym jego cząsteczki pozostają niezdisocjowane. Natomiast po dodaniu wody pewien procent jego cząsteczek ulega dysocjacji. Kwas octowy jest słabym kwasem organicznym o wartości stałej dysocjacji wynoszącej $\text{pK}_a = 4.76$. Opisuje ona stan równowagi dla chemicznej reakcji dysocjacji na jony. W obecności wody stopień jego dysocjacji wzrasta, ponieważ jego cząsteczka jest donorem jonu wodorowego, który po przekazaniu do cząsteczki wody tworzy tzw. jon hydroniowy H_3O^+ , [99]. Policzone na podstawie pK_a , oraz molowego stężenia roztworu procentowe wartości stopnia dysocjacji cząsteczek kwasu na jony CH_3COO^- i H^+ dla rozpuszczalników AA30 i AA15 wynoszą odpowiednio: 0.097 i 0.098. Stopień dysocjacji kwasu w obu rozpuszczalnikach jest rzędu jednej dziesiątej procenta. Natomiast policzona na podstawie tych samych danych wartość pH w obu roztworach kwasu octowego z wodą wynosi 1.78 dla AA30 i 1.79 dla AA15. Najniższy raportowany wskaźnik pH w wakuoli (lizosomie) pasożyta malarii *Plasmodium falciparum* wynosi 4.5-4.9 [100], zatem roztwory meso-hematyny z dodatkiem cząsteczek wody są zdecydowanie bardziej kwaśne. Grupy propylowe pierścienia FePPIX również są potencjalnymi donorami jonu wodorowego, ponieważ w obecności wody mogą ulegać dysocjacji. Ich stała dysocjacji ma wartość $\text{pK}_a = 4.8-5.0$. W kwaśnym pH, charakterystycznym dla wakuoli pasożyta, antymalaryczny lek chlorochinina jest akceptorem dwóch jonów wodorowych. Stąd wytłumaczenie nagromadzenia jej cząsteczek w kwaśnym środowisku lizosomu czyli wakuoli organizmu pasożyta [101, 102]. Kwas octowy został wybrany jako rozpuszczalnik po to, by odtworzyć kwasowe właściwości środowiska wakuoli pasożyta. Dodanie pewnej objętości wody powoduje uaktywnienie właściwości dysocjacyjnych kwasu i grup propylowych meso-hematyny. Takie a nie inne objętości dodanej wody zostały wybrane ze względu na otrzymane przez grupę S.D. Bohle’a rezultaty spektroskopowych badań UV, do których nie można się w tym momencie odnieść ze względu na brak publikacji.

Analiza widm EXAFS

Transformaty Fouriera eksperymentalnych widm EXAFS dla par widm roztworu meso-hematyny bez i z chlorochiną dla rozpuszczalnika o identycznym składzie umieszczono na rys. 5.17, rys. 5.18, rys. 5.19. Analiza, podobnie jak dla związków proszkowych, została ograniczona do strefy o promieniu $4.35\text{\AA}$ wokół absorbującego atomu żelaza i taką przyjęto wartość górnej granicy przestrzeni transformat Fouriera $\chi(k)$ przy porównaniu ich kształtu.

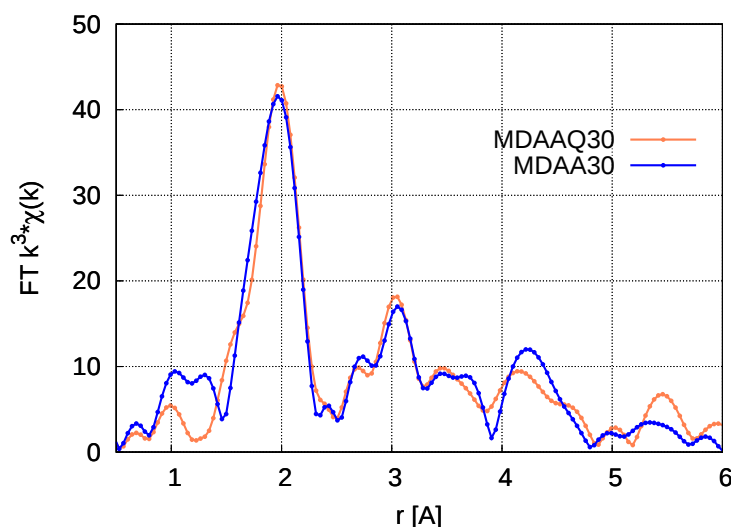


Rysunek 5.17. Transformata fouriera funkcji $\chi(k)$ dla MDAA i MDAAQ.

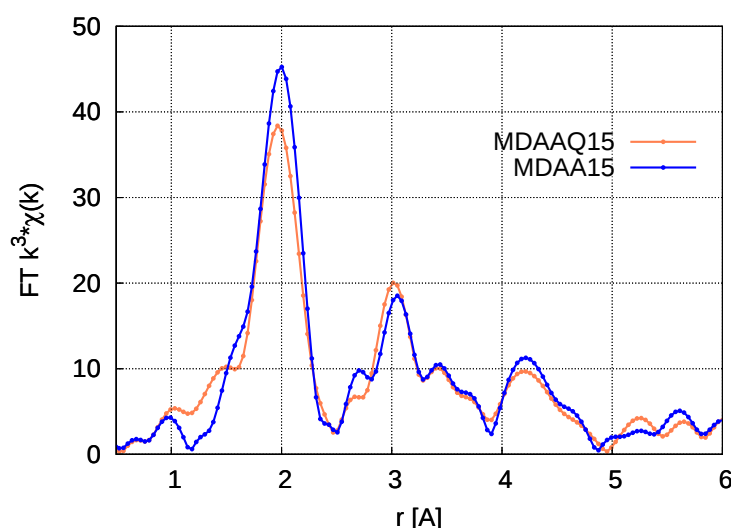
Różnice pomiędzy kształtem transformat Fouriera dla MDAA i MDAAQ są zauważalne w zakresie $1.5 - 4.2\text{\AA}$. Wskazują one na zmiany uporządkowania strukturalnego w strefie osiowego atomu tlenu i czterech atomów azotu z pierścieni pirylowych protoporfiryny, oraz ubytek, bądź znaczne nieuporządkowanie atomów w strefach oddalonych od absorbera o około $2.8\text{\AA}$ i $3.3 - 3.5\text{\AA}$ po dodaniu chlorochininy.

W zakresie odpowiadającym pierwszej strefie, szczególnie dla położenia osiowego atomu tlenu najbliższego do żelazowego absorbera ulega zmianie kształt transformaty Fouriera widma dla roztworu MDAAQ30 w stosunku do transformaty widma MDAA30. Na podstawie różnicy można wyciągnąć wniosek o zmianie odległości żelazo - tlen osiowy po oddziaływaniu pomiędzy cząsteczką meso-hematyny a cząsteczką antymalarycznego leku. Widoczne są również różnice w zakresie $2.8\text{\AA} - 3.5\text{\AA}$ dla obu transformat.

Różnice kształtu transformat Fouriera funkcji $\chi(k)$ dla pary roztworów MDAA15 i MDAAQ15 są widoczne przede wszystkim w zakresie $1.4 - 3.2\text{\AA}$ i wskazują na zmiany uporządkowania strukturalnego w strefie osiowego atomu tlenu i czterech atomów azotu pierścienia ferriprotoporfirynowego. Przedstawiono również zestawienie transformat Fouriera wszystkich roztworów meso-hematyny bez dodatku chlorochininy, oraz wszystkich roztworów w obecności antymalarycznego lekarstwa, rys. 5.20. Wyraźne różnice już dla pierwszej strefy osiowego atomu tlenu i czterech pierścieniowych atomów azotu w obu grupach świadczą o znacznym wpływie właściwości i składu rozpuszczalnika, w tym wypadku dodanej objętości



Rysunek 5.18. Transformata fouriera funkcji $\chi(k)$ dla MDAA30 i MDAAQ30.

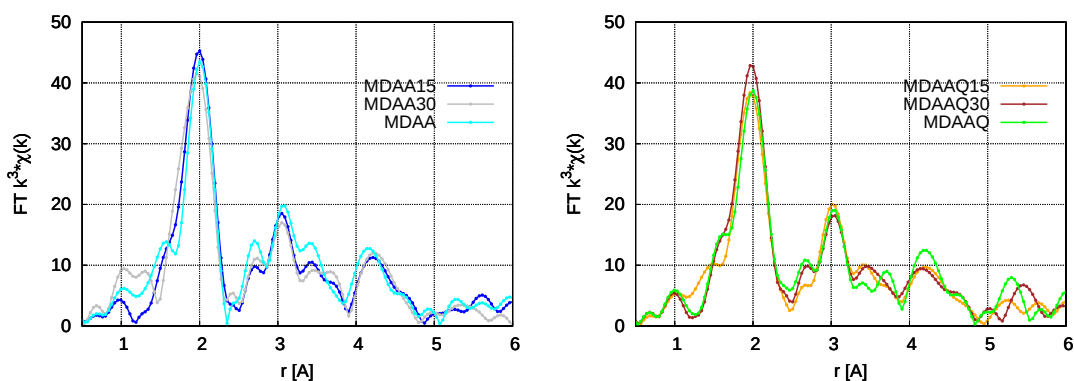


Rysunek 5.19. Transformata fouriera funkcji $\chi(k)$ dla MDAA15 i MDAAQ15.

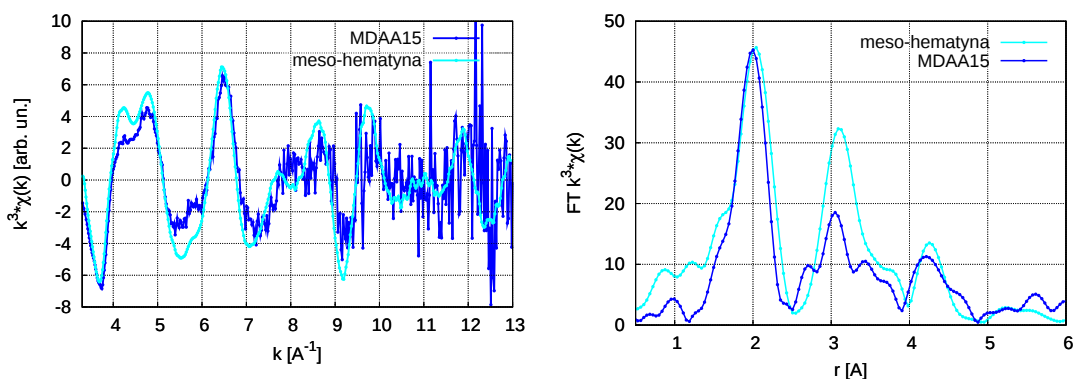
wody, na rozkład i uporządkowanie atomów wokół absorbującego atomu żelaza w rozpuszczonej meso-hematynie.

Położono zatem nacisk na analizę i porównywanie parametrów dopasowania EXAFS w następujących parach widm: MDAA i MDAAQ, MDAA30 i MDAAQ30, oraz MDAA15 i MDAAQ15, czyli absorpcyjnych widm na krawędzi K żelaza dla cząsteczek meso-hematyny bez i w obecności chlorochininy w tym samym rozpuszczalniku.

Kolejne zestawienie funkcji $\chi(k)$ i transformat Fouriera zostało przedstawione na rys. 5.21 i dotyczy funkcji EXAFS przykładowego widma roztworu meso-hematyny w kwasie octowym MDAA15 i funkcji EXAFS proszkowej meso-hematyny. Zakres transformowanej funkcji $\chi(k)$ dla związku proszkowego został ograniczony do $13\text{\AA}^{-1}$ i jest to zakres z którego funkcja $\chi(k)$ była transformowana do przestrzeni odległości dla każdego roztworu kwasu octowego.



Rysunek 5.20. Zestawienie transformat Fouriera funkcji $\chi(k)$ dla meso-hematyny w roztworach bez chlorochininy (po lewej) i meso-hematyny w roztworach z chlorochinina (po prawej).



Rysunek 5.21. Przykładowa funkcja $\chi(k)$ dla roztworów - MDAA15 oraz jej transformata Fouriera w zestawieniu z funkcja $\chi(k)$ oraz jej transformata dla meso-hematyny w postaci proszku. Zakres funkcji $\chi(k)$ tej ostatniej został ograniczony do $13 \text{\AA}^{-1}$.

Różnice w funkcji $\chi(k)$ obu związków są widoczne przede wszystkim w zakresie $4\text{--}5 \text{\AA}^{-1}$ oraz $5.2\text{--}6 \text{\AA}^{-1}$. Struktura w zakresie od 7 do $9 \text{\AA}^{-1}$ jest wyraźnie przesunięta dla roztworu w kierunku wyższych wartości wektora falowego. Natomiast w transformacie Fouriera ulega zawężeniu pik w zakresie odległości osiowego tlenu i czterech atomów azotu, co można interpretować jako ujednolicenie odległości atomów azotu od żelaza przy jednoczesnym ich skróceniu. Znaczna różnica zostaje odnotowana w zakresie $2.9\text{--}3.5 \text{\AA}$, gdzie intensywność pików w maksimum ok. $3.1 \text{\AA}$ dla roztworu bardziej odpowiada intensywności pików w tym położeniu dla hematyny niż meso-hematyny. W każdej z transformat widm roztworów pojawia się dodatkowa struktura w położeniu $2.8 \text{\AA}$, której nie ma w kształcie transformaty meso-hematyny proszkowej.

Pierwszym krokiem w analizie widm EXAFS powyżej wyszczególnionych roztworów było dopasowanie ich według modelu jednostki strukturalnej dla cząsteczki złożonej z dwóch pierścieni protoporfiryny IX, dokładnie takiej, jaka wykorzystano uprzednio przy analizie meso-hematyny w postaci mikrokryształicznego proszku. Z założenia przyjęto, że pod wpływem roztworu bez dodatku chlorochininy dimerowa

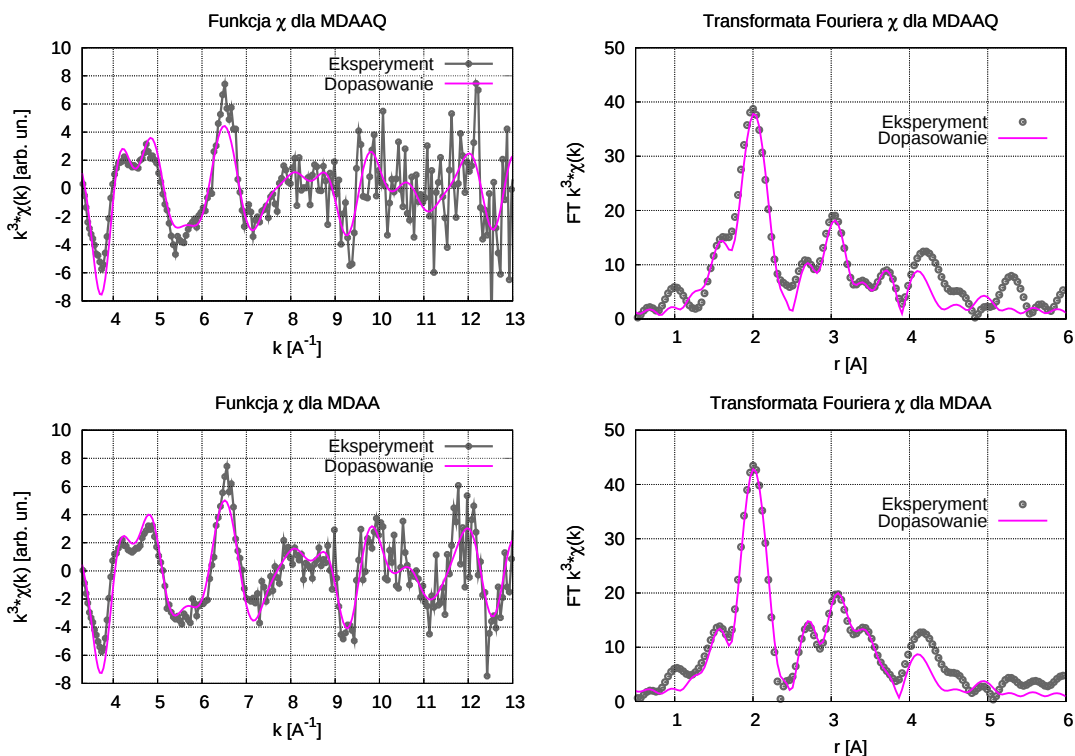
struktura cząsteczki meso-hematyny nie ulegała zmianie. Okazało się jednak, że model cząsteczki dimerowej nie jest w tym wypadku poprawny. Liczba koordynacyjna osiowego tlenu nie przekroczyła wartości 0.35 przy dopasowaniu widna jakiegokolwiek z roztworów. Co więcej taka wartość liczby koordynacyjnej osiowego tlenu jest bardziej zbliżona do odpowiadającej jej wartości dla związku o cząsteczce zbudowanej z pojedynczego pierścienia FePPIX - hematyny, gdzie została wyznaczona z wartością 0.5 niż dla meso-hematyny - 1. Strategia dopasowania została zatem zmieniona i każde z widm roztworu dopasowywano według jednostki strukturalnej związku złożonego z pojedynczego pierścienia FePPIX z dodatkowymi atomami tlenu i węgla, które mogą pochodzić zarówno od cząsteczek roztworu (tlen, węgiel) jak i cząsteczek chlorochininy (węgiel). Jako najbardziej odpowiedni model struktury wejściowej uznano model pierścienia FePPIX otrzymany po końcowym dopasowaniu związku mikrokryształicznej meso-hematyny, ponieważ tak scharakteryzowany materiał był następnie wykorzystany do przygotowania roztworów.

Parametry uzyskane w procesie dopasowania funkcji $\chi(k)$ dla pary roztworów MDAA i MDAAQ przedstawiono w tab. 5.11 a graficzne porównanie funkcji $\chi(k)$ i dopasowanej funkcji EXAFS na rys. 5.22.

	MDAA			MDAAQ		
R	53.29			61.04		
FI	0.00208			0.00312		
EF	-3.0±0.8			-3.0±1.2		
X	N(X)	r(Fe-X) [Å]	2σ ² (X) [Å ²]	N(X)	r(Fe-X) [Å]	2σ ² (X) [Å ²]
O ₁ os.	0.34±0.03	1.77±0.02	0.002±0.001	0.35±0.04	1.78±0.04	0.0022±0.0017
N ₁₂₃₄	4	2.05±0.01	0.013±0.002	4	2.05±0.02	0.015±0.004
C _α	8	3.08±0.02	0.011±0.004	8	3.08±0.03	0.012±0.008
C _{meso}	4	3.40±0.04	0.012±0.006	4	3.41±0.06	0.014±0.009
C _β	8	4.31±0.06	0.018±0.008	8	4.31±0.07	0.018±0.011
O ₁ p.p. d.	2.10±0.08	2.85±0.04	0.006±0.003	1.50±0.11	2.85±0.06	0.006±0.004
O ₂ p.p. d.	1.11±0.11	3.34±0.07	0.004±0.002	0.61±0.16	3.29±0.12	0.004±0.002
C ₁ p.p. d.	2.22±0.25	3.61±0.11	0.003±0.002	1.88±0.23	3.59±0.08	0.003±0.002
O ₃ p.p. d.	1.56±0.22	3.75±0.09	0.004±0.002	2.86±0.30	3.75±0.11	0.004±0.002

Tabela 5.11. Parametry dopasowania dla atomów i ich grup w strukturze jednostki strukturalnej dla cząsteczki o pojedynczym pierścieniu FePPIX + dodatkowe atomy tlenu i węgla (oznaczone jako p.p. d.) dla roztworów meso-hematyny w kwasie octowym: MDAA i MDAAQ.

Parametry dopasowania funkcji $\chi(k)$ dla pary MDAA i MDAAQ wskazują na brak zmian w granicach wyznaczonych niepewności w pierścieniu FePPIX zarówno pod względem odległości pierwiastków w poszczególnych strefach jak i ich nieuporządkowania strukturalnego. Nie zanotowano również różnic w parametrach dla osiowego tlenu. Występuje on średnio w co trzeciej cząsteczce jako ligand żelaza w tej samej odległości i z tym samym nieuporządkowaniem strukturalnym dla roztworu zarówno przed jak i po dodaniu chlorochininy. Z wartości liczby koordynacyjnej tlenu w cząsteczce pierścienia FePPIX dla MDAA wynika, że już sam roztwór wpływa na zerwanie wiązań mostkowych w cząsteczce dimerowej a osiowy atom tlenu podlega ciągłej wymianie z otaczającymi atomami tego samego rodzaju. Atom tlenu może pochodzić z grupy OH i OH₂ podobnie jak w hematynie, lub też być częścią cząsteczki kwasu octowego. To samo dotyczy osiowego tlenu dla cząsteczek pierścienia FePPIX roztworu MDAAQ z chlorochiną. Zauważalne



Rysunek 5.22. Funkcje $\chi(k)$ wraz z funkcją dopasowaną dla MDAA i MDAAQ, oraz ich transformaty Fouriera.

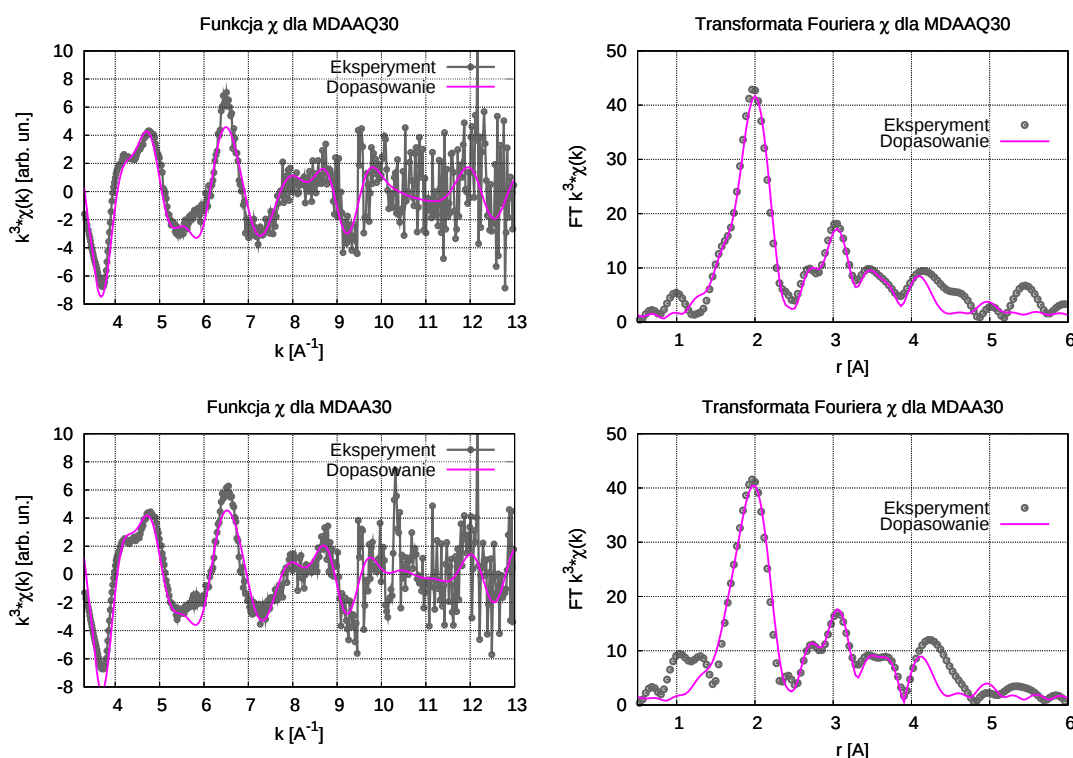
zmiany zachodzą dla parametru liczby koordynacyjnej atomu tlenu w odległości $2.85\text{\AA}$ od centralnego absorbera. Takie same zmiany dotyczą atomów tlenu i węgla w pozycjach odpowiednio $3.29\text{--}3.34\text{\AA}$. We wszystkich trzech pozycjach po dodaniu chlorochininy zmniejsza się liczba atomów. Natomiast w pozycji $3.75\text{\AA}$ występuje tendencja odwrotna. Parametry dopasowania dla widm obydwu roztworów wskazują na tendencje wzrostu nieuporządkowania parametrów w pierwszej strefie koordynacyjnej dla atomów osiowego tlenu i czterech atomów azotu, co może tłumaczyć widoczne różnice w ich transformatach Fouriera.

Rezultaty dopasowania dla kolejnej pary roztworów MDAA30 i MDAAQ30 przedstawiono w tab. 5.12 a graficznie na rys. 5.23.

Podobnie jak dla poprzednio omawianej pary parametr liczby koordynacyjnej tlenu osiowego w roztworze MDAA30 jest na takim samym poziomie, będąc jednocześnie mniejszy od jeden, co świadczy o zerwaniu wiązań mostkowych i o zachodzącej wymianie osiowego atomu. Dodanie określonej objętości wody do kwasu octowego (w stosunku 1:30) w rozpuszczalniku powoduje jednak zwiększenie średniej odległości żelazowy absorber - osiowy tlen o $0.1\text{\AA}$ w stosunku do odległości tego atomu w roztworach MDAA i MDAAQ bez dodatku wody. Co więcej w rozpuszczalniku AA30 po dodaniu chlorochininy maleje znacząco o 34 procent liczba koordynacyjna osiowego tlenu a długość jego wiązania skraca się o $0.05\text{\AA}$. Nie ulegają zmianie natomiast ani parametry odległości ani parametry uporządkowania strukturalnego w atomach pierścienia FePIX w ramach wyznaczonej niepewności. Parametry dopasowania świadczą o występowaniu w pozycji około $2.85\text{\AA}$ kolejnego atomu tlenu w roztworze MDAA30, jednak w mniejszej liczebności niż

	MDAA30			MDAAQ30		
R	44.65			41.81		
FI	0.00166			0.00138		
EF	-3.0 ± 0.6			-3.0 ± 0.6		
X	N(X)	r(Fe-X) [Å]	$2\sigma^2(X)$ [Å ²]	N(X)	r(Fe-X) [Å]	$2\sigma^2(X)$ [Å ²]
O ₁ os.	0.32 ± 0.02	1.87 ± 0.01	0.0014 ± 0.0008	0.21 ± 0.03	1.82 ± 0.02	0.002 ± 0.001
N ₁₂₃₄	4	2.05 ± 0.01	0.012 ± 0.002	4	2.05 ± 0.01	0.013 ± 0.003
C _α	8	3.08 ± 0.02	0.013 ± 0.003	8	3.08 ± 0.03	0.013 ± 0.002
C _{meso}	4	3.40 ± 0.03	0.013 ± 0.006	4	3.41 ± 0.06	0.016 ± 0.006
C _β	8	4.31 ± 0.03	0.018 ± 0.006	8	4.31 ± 0.04	0.018 ± 0.005
O ₁ p.p. d.	1.50 ± 0.07	2.85 ± 0.07	0.006 ± 0.003	1.26 ± 0.06	2.86 ± 0.09	0.006 ± 0.004
O ₂ p.p. d.	-	-	-	-	-	-
C ₁ p.p. d.	2.28 ± 0.15	3.62 ± 0.12	0.003 ± 0.001	2.35 ± 0.23	3.61 ± 0.13	0.003 ± 0.002
O ₃ p.p. d.	2.90 ± 0.28	3.76 ± 0.12	0.004 ± 0.003	1.91 ± 0.20	3.75 ± 0.20	0.004 ± 0.002

Tabela 5.12. Parametry dopasowania dla atomów i ich grup w strukturze jednostki strukturalnej cząsteczek o pojedynczym pierścieniu FePPIX + dodatkowe pozapierścieniowe atomy oznaczone jako p.p. d. w modelu struktury dla roztworów meso-hematyny w kwasie octowym: MDAA30 i MDAAQ30.



Rysunek 5.23. Funkcje $\chi(k)$ wraz z funkcją dopasowaną dla MDAA30 i MDAAQ30, oraz ich transformaty Fouriera.

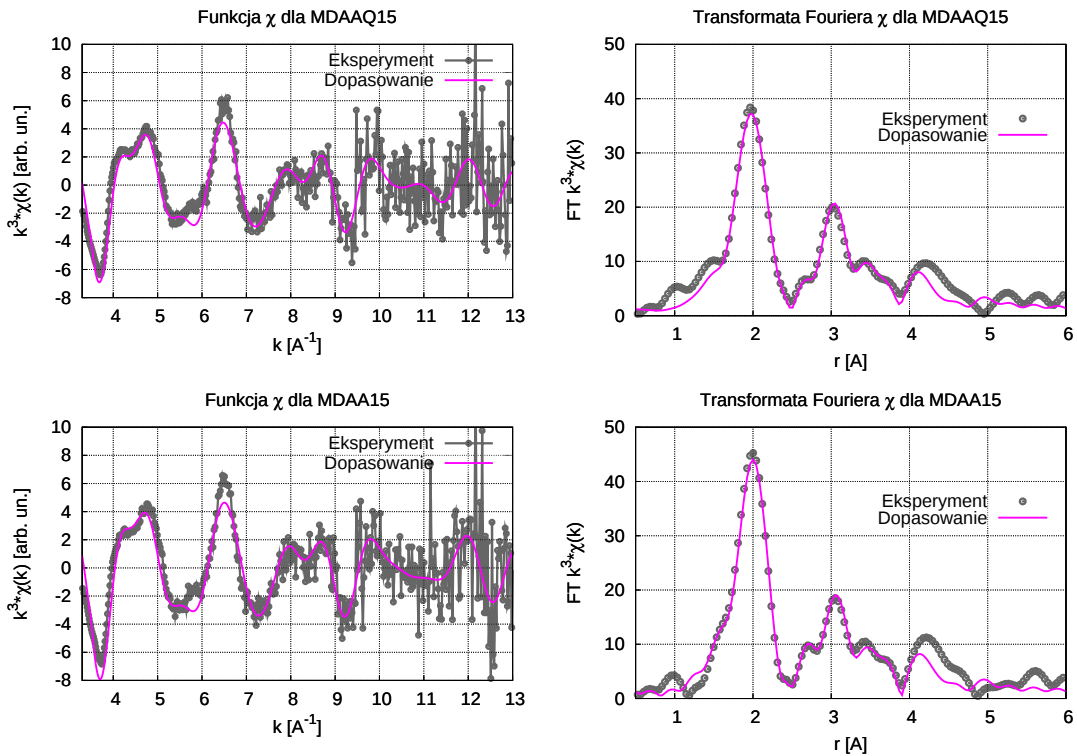
w roztworze bez wody. Jego liczba koordynacyjna zmniejsza się po dodaniu chlorochininy podobnie jak liczba koordynacyjna kolejnego atomu tlenu w pozycji $3.76\text{\AA}$ która maleje znacząco po dodaniu antymalarycznego leku. Nie stwierdzono natomiast obecności atomu tlenu w odległości $3.34\text{\AA}$ ani w modelu strukturalnym dla MDAA30 ani dla roztworu MDAAQ30. Brak znaczących różnic w położeniach dodatkowych węgli pozapierścieniowych w wyznaczonej strukturze wokół żelaza dla MDAA30 i MDAAQ30.

Rezultaty dopasowania kolejnej pary widm EXAFS roztworów MDAA15 i

MDAAQ15 przedstawiono w tab. 5.13 a graficznie na rys. 5.24.

	MDAA15			MDAAQ15		
R	37.75			40.31		
FI	0.00112			0.00133		
EF	-3.0 ± 0.4			-3.0 ± 0.6		
X	N(X)	r(Fe-X) [Å]	$2\sigma^2(X)$ [Å ²]	N(X)	r(Fe-X) [Å]	$2\sigma^2(X)$ [Å ²]
O ₁ os.	0.18±0.03	1.80±0.02	0.0020±0.0008	0.09±0.07	1.71±0.06	0.0016±0.0015
N ₁₂₃₄	4	2.05±0.01	0.012±0.002	4	2.04±0.02	0.017±0.002
C _α	8	3.08±0.01	0.012±0.003	8	3.08±0.04	0.011±0.002
C _{meso}	4	3.40±0.03	0.011±0.006	4	3.40±0.06	0.015±0.004
C _β	8	4.31±0.03	0.018±0.008	8	4.31±0.04	0.018±0.008
O ₁ p.p. d.	1.35±0.07	2.85±0.07	0.006±0.002	0.95±0.10	2.86±0.06	0.006±0.001
O ₂ p.p. d.	-	-	-	-	-	-
C ₁ p.p. d.	2.56±0.15	3.61±0.09	0.003±0.002	2.48±0.13	3.62±0.10	0.003±0.001
O ₃ p.p. d.	1.96±0.13	3.76±0.09	0.004±0.002	1.85±0.10	3.75±0.08	0.004±0.002

Tabela 5.13. Parametry dopasowania dla atomów i ich grup w strukturze jednostki strukturalnej cząsteczek o pojedynczym pierścieniu FePPIX + dodatkowe pozapierścieniowe atomy oznaczone jako p.p. d. w modelu struktury dla roztworów meso-hematyny w kwasie octowym: MDAA15 i MDAAQ15.

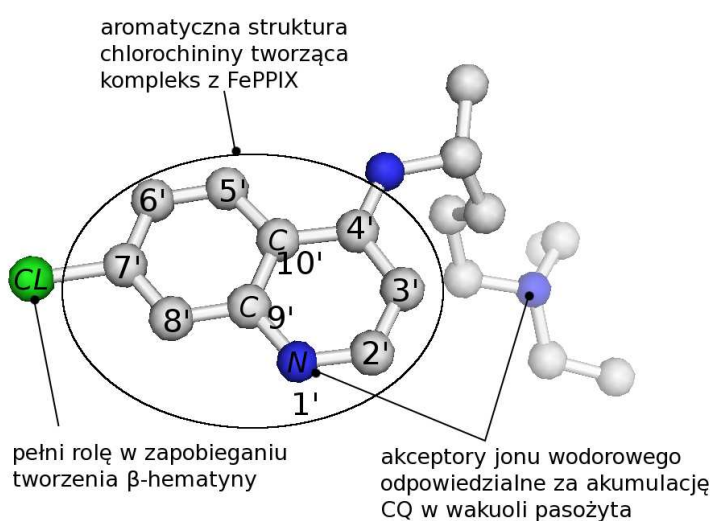


Rysunek 5.24. Funkcje $\chi(k)$ wraz z funkcją dopasowaną dla MDAA15 i MDAAQ15, oraz ich transformaty Fouriera.

Parametry dopasowania MDAA15 i MDAA15Q wskazują na ten sam charakter zmiany liczby koordynacyjnej osiowego tlenu po dodaniu chlorochininy co parametry dopasowania EXAFS dla MDAA30 i MDAA30Q. Dla MDAA15Q wartość jej jest na poziomie dziesiątej części jednostki, ale została określona z dużą niepewnością pozwalającą na założenie, że liczba koordynacyjna atomu może być

bliska zeru. Skróceniu ulega również odległość osiowego tlenu do centralnego absorbera o $0.09\text{\AA}$. Nieobecność osiowego tlenu w dziewięciu pierścieniach FePPIX na dziesięć w roztworze MDAA15Q jest najprawdopodobniej silnie skorelowana ze skróceniem odległości (zmiana mieści się w granicy niepewności dopasowywanego parametru) czterech pierścieniowych atomów azotu, oraz znaczącym wzrostem o 0.005 ich nieuporządkowania strukturalnego. Odległości oraz nieuporządkowanie strukturalne na podstawie parametrów w granicy wyznaczonej niepewności pozostałych atomów pierścienia FePPIX pozostają niezmiennic. Wartość parametru liczby koordynacyjnej tlenu zidentyfikowanego w odległości $2.85\text{\AA}$ ulega kolejnemu zmniejszeniu po dodaniu antymalarycznego leku. W przypadku pary MDAA15 i MAA15Q nie zauważono znaczących zmian liczby koordynacyjnej odległości czy nieuporządkowania pozostałych pozapierścieniowych atomów. Podobnie jak dla MDAA30 i MDAAQ15 nie stwierdzono obecności atomu tlenu w pozycji $3.34\text{\AA}$.

Charakterystyczną zmianą pozostającą jednak w granicach wyznaczonej niepewności dla wszystkich par roztworów MDAA i MDAAQ, MDAA30 i MDAA30Q oraz MDAA15 i MDAA15Q jest wzrost wartości czynnika Debya-Wallera czyli wzrost nieuporządkowania strukturalnego w strefie węgla typu C_{meso} . Znacząco inne zachowanie osiowego tlenu zaobserwowano po dodaniu chlorochininy tylko w obecności wody, co świadczyłoby o istotnym znaczeniu procesu dysocjacji lub hydrofobowości pierścienia FePPIX dla tworzenia stabilnego kompleksu pierścień FePPIX - chlorochinina w roztworze kwasu octowego. Zaproponowane w literaturze [103] funkcje poszczególnych grup atomów w cząsteczce chlorochininy w naturalnym środowisku wakuoli pasożyta zamieszczono na rys. 5.25. Zgodnie z tym schematem tylko aromatyczna grupa atomów, oraz atom Cl oddziałuje bezpośrednio z cząsteczką FePPIX, natomiast obecność pozostałych atomów jest niezbędna do akumulacji antymalarycznego leku w wakuoli pasożyta.



Rysunek 5.25. Cząsteczka chlorochininy (CQ) z zaznaczeniem funkcji poszczególnych grup jej atomów [103]. Kolorem zielonym oznaczono atom chloru, szarym - atomy węgla a niebieskim atomy azotu.

Uzyskane wyniki analizy EXAFS wskazują jednoznacznie na brak dodatkowych

atomów zarówno lekkich typu węgiel i azot jak też cięższego atomu chloru mogących pochodzić z cząsteczki chlorochininy w strefie koordynacyjnej w odległości poniżej $3.4\text{\AA}$ od absorbującego atomu żelaza. Dla atomu chloru dopasowania EXAFS rozszerzają ten zakres do $4.0\text{\AA}$. Jest to atom silniej rozpraszający dlatego jego obecność w dalszej odległości od żelaza jest jednoznacznie rozpoznawalna. Efekt działania chlorochininy zaobserwowano w widmach $\chi(k)$ roztworów dla rozpuszczonej meso-hematyny tylko w obecności wody i polega on na zmniejszeniu wartości liczby koordynacyjnej dla osiowego tlenu oraz tlenu w pozycji $2.85\text{\AA}$. Tlen w pozycji $2.85\text{\AA}$ jest najprawdopodobniej atomem pochodzącym z cząsteczki kwasu octowego, ponieważ został dopasowany już w modelu strukturalnym dotyczącym roztworów bez obecności chlorochininy. Można zatem wysunąć wniosek, że chlorochinina tworzy z pierścieniem FePPIX kompleks redukując jednocześnie wpływ atomów roztworu. Redukcja liczby koordynacyjnej tlenu osiowego wyklucza wiązanie chlorochininy poprzez ten atom, ponieważ gdyby tak było wiązanie żelazo - osiowy tlen pozostałoby stabilne, tak jak ma to miejsce w przypadku wiązania w cząsteczce dimerowej w roztworze dimetylosulfotlenku (patrz kolejny rozdział dotyczący meso-hematyny w DMSO). Chlorochinina nie wiąże się zatem z pojedynczym pierścieniem FePPIX w podobny sposób jak halofantrine [104]. Być może kompleks pierścienia FePPIX powstaje przez wiązanie atomu azotu grupy niearomatycznej chlorochininy z grupami propylowymi pierścienia tak jak zaproponowane zostało przez M. Dascombe [105] dla wiązania hemina - chlorochinina, zachodzi to jednak w odległości przekraczającej analizowane strefy koordynacyjne. Analiza EXAFS nie przedstawia dowodów na istnienie wiązania $\pi - \pi$ części pierścieni aromatycznych obydwu związków nie wykluczając jednocześnie tej możliwości z zastrzeżeniem, że najbliższy atom cząsteczki chlorochininy od żelazowego absorbera jest w odległości nie mniejszej od $3.6\text{\AA}$. Obserwowane zmiany parametrów dopasowania w obecności chlorochininy dla danego roztworu tylko w wypadku dodania cząsteczek wody potwierdzają wcześniejsze doniesienia w literaturze o zwiększonym prawdopodobieństwie tworzenia kompleksu FePPIX - chlorochinina w obecności H_2O [106]. Badanie tego efektu za pomocą wyznaczania logarytmicznej wartości stałej równowagi w metodzie miareczkowania dotyczyło związków typu chinina w tym chlorochininy w $\text{pH} = 7.5$ dla roztworu. EXAFS potwierdza znaczenie obecności wody dla stworzenia stabilnego kompleksu również w roztworze o kwaśnym pH.

Wpływ obecności wody na strukturę cząsteczki FePPIX przedstawia tab. 5.14, w której porównano parametry dopasowania funkcji $\chi(k)$ dla meso-hematyny rozpuszczonej w trzech rodzajach rozpuszczalnika AA, AA30 i AA15 oraz proszkowej meso-hematyny.

Z zestawienia wynika, że bez względu na objętość dodanej wody (1 jednostka na 30 i 15 jednostek kwasu octowego) wartości parametrów odległości poszczególnych pierwiastków w strefach pierścienia FePPIX, oraz ich nieuporządkowanie strukturalne pozostają bez zmian na poziomie wyznaczonej niepewności dla każdego z roztworów. Natomiast w stosunku do proszkowej meso-hematyny można zauważyć następujące znaczące zmiany takie jak: ujednolicenie i skrócenie odległości wiązań czterech pierścieniowych atomów azotu w stosunku do ich średniej dla proszkowej meso-hematyny - $2.072\text{\AA}$, skrócenie odległości od absorbera dla atomów w strefie węgli typu C_{meso} , oraz wzrost nieuporządkowania strukturalnego

	MDAA	MDAA30	MDAA15	meso-hematyna
R=	53.29	44.65	37.75	27.85
FI=	0.00208	0.00166	0.00112	0.00007
N(Fe-O ₁ os.)	0.34 ±0.03	0.32±0.02	0.18±0.03	1
r(Fe-O ₁ os.)	1.77 ±0.03	1.87±0.01	1.80±0.02	1.90±0.02
r(Fe-N ₁)	2.05 ±0.01	2.05±0.01	2.05±0.01	2.058±0.009
r(Fe-N ₂)	2.05	2.05	2.05	2.065±0.009
r(Fe-N ₃)	2.05	2.05	2.05	2.077±0.009
r(Fe-N ₄)	2.05	2.05	2.05	2.088±0.009
r(Fe-C _α)	3.08x8 ±0.02	3.08x8±0.02	3.08x8±0.01	3.088x4±0.007 3.095x4±0.007
r(Fe-C _{meso})	3.40 ±0.04	3.40±0.03	3.40±0.03	3.46±0.01
r(Fe-C _β)	4.31x8 ±0.06	4.31x8±0.03	4.31x8±0.03	4.27x4±0.03 4.30x4±0.04
2σ ² (O ₁)	0.002±0.001	0.0014±0.0008	0.0020±0.0008	0.012±0.002
2σ ² (4N)	0.013±0.002	0.012±0.002	0.012±0.002	0.0073±0.0005
2σ ² (C _α)	0.011±0.004	0.013±0.003	0.012±0.003	0.007±0.001
2σ ² (C _{meso})	0.012±0.006	0.013±0.006	0.011±0.006	0.009±0.002
2σ ² (C _β)	0.018±0.008	0.018±0.006	0.018±0.008	0.021±0.006

Tabela 5.14. Parametry dopasowania EXAFS dla roztworów bez obecności chlorochininy w porównaniu z parametrami dla meso-hematyny proszkowej.

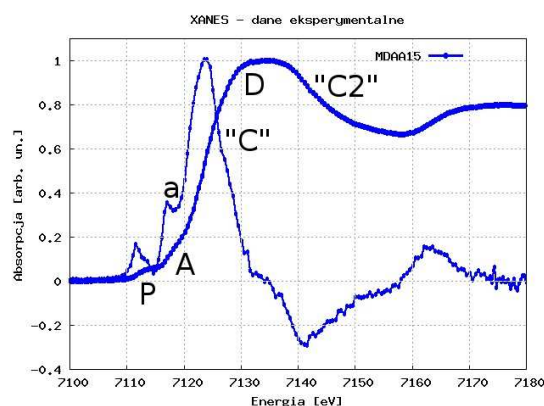
dla strefy atomów azotu oraz węgla typu C_α w pierścieniu FePPIX. Bardzo istotne jest to, że w zależności od dodanej objętości wody zmienia się charakterystyka wiązania osiowego tlenu pozapierścieniowego. Dla MDAA30 zwiększa się odległość tego atomu od absorbera o 0.1Å w stosunku do roztworu bez wody a dla MDAA15 zmniejsza się o 47 procent jego liczba koordynacyjna. W analizie EXAFS parametr liczby koordynacyjnej jest skorelowany z parametrem nieuporządkowania strukturalnego 2σ², dlatego dopasowanie parametru liczby koordynacyjnej z wartością znacznie mniejszą niż 1 wpłynęło również na zmniejszenie wartości nieuporządkowania strukturalnego.

Jeśli efektem działania chlorochininy w obecności cząsteczek wody jest, tak jak sugeruje EXAFS, wzrost ilości cząsteczek FePPIX z żelazem na trzecim stopniu utlenienia bez stabilnego wiązania ligandu, to lek ten powoduje wzrost ilości reaktywnego Hemu Fe(III) w wakuoli i cytoplazmie komórki pasożyta a zatem działa poprzez stres oksydacyjny i w konsekwencji powoduje rozpad komórki pasożyta.

Analiza widm XANES

Porównanie widm dla par roztworów: MDAA-MDAAQ, MDAA30-MDAAQ30, oraz MDAA15-MDAAQ15 przeprowadzono również w zakresie energetycznym XANES. Na rys. 5.26 przedstawiono przykładowe widmo XANES i jego pochodną dla meso-hematyny w roztworze kwasu octowego, z zaznaczeniem charakterystycznych struktur.

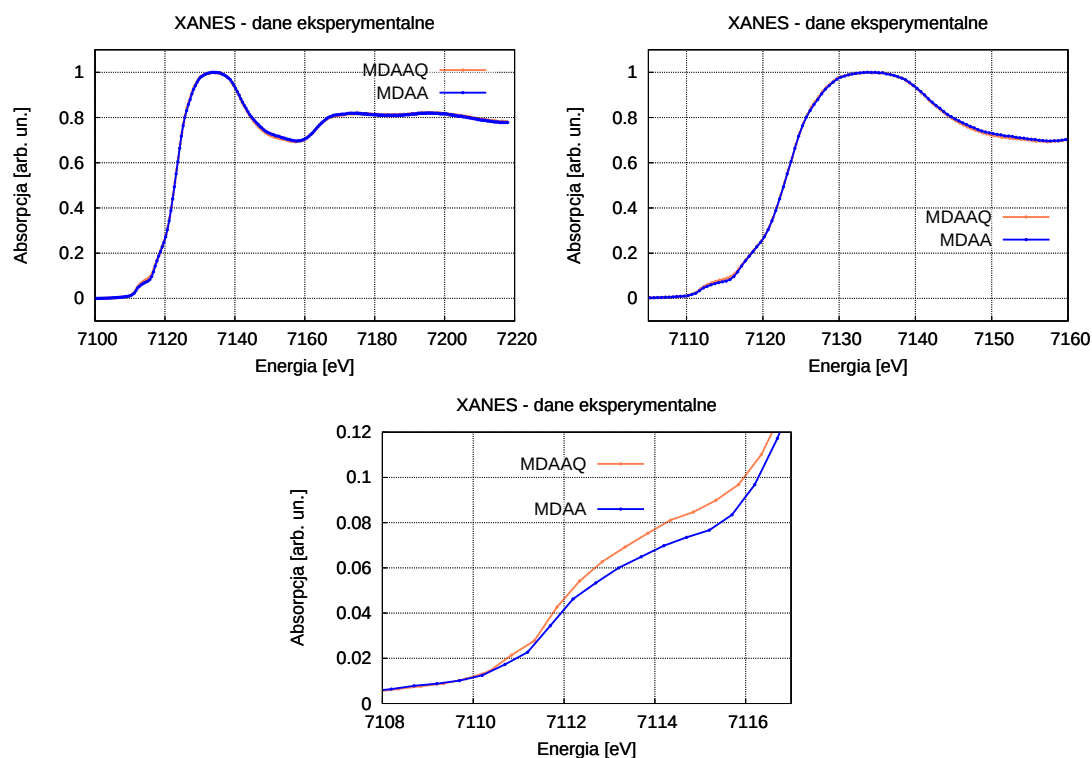
Wszystkie widma XANES dla roztworów, rys. 5.27, rys. 5.28, rys. 5.29 zawierają charakterystyczne struktury: P (7113eV), A (7118eV), szerokie platou D w maksimum w położeniu od 7131eV do 7135eV i najwyraźniej zarysowaną dla pary MDAA-MDAAQ strukturę C2 w położeniu 7153eV. W parach pomiędzy XANES dla roztworów z i bez chlorochininy różnią się nieznacznie MDAA30 z



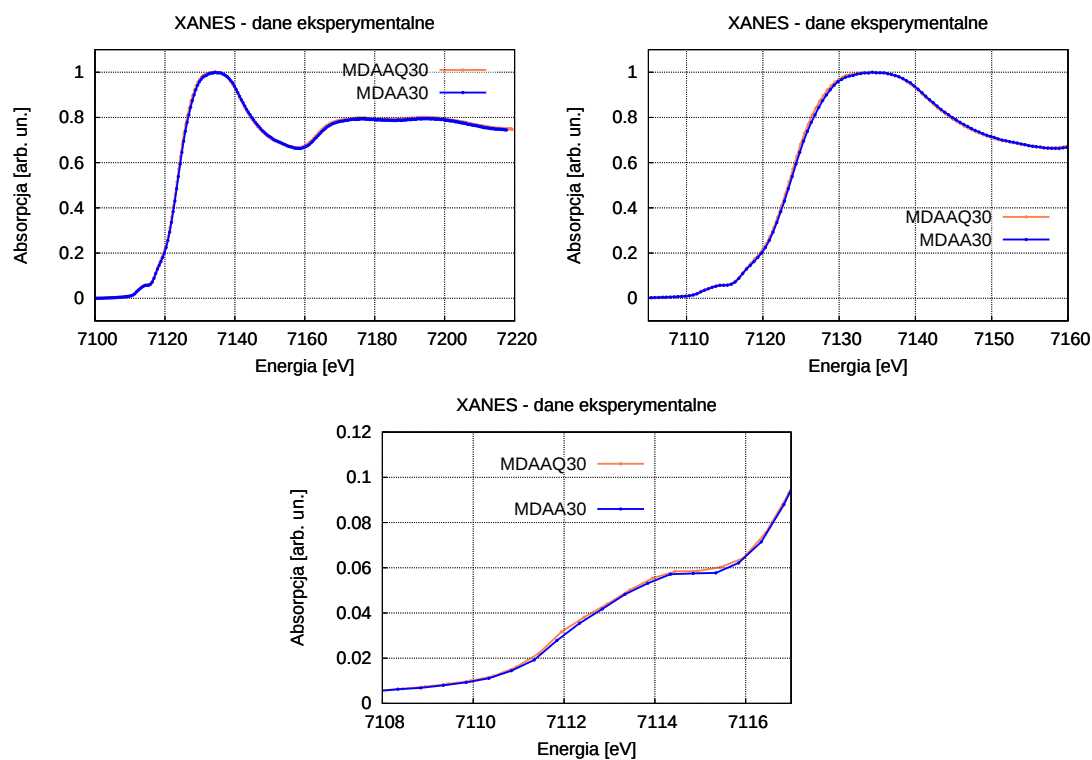
Rysunek 5.26. Eksperymentalne widmo XANES i jego pochodna dla meso-hematyny w roztworze kwasu octowego MDAA15 z zaznaczonymi miejscami pojawiania się charakterystycznymi struktur dla widma porfiry z centralnym atomem żelaza i osiowymi ligandami. Duże litery odnoszą się do widma XANES a małe do jego pochodnej. Cudzysłów oznacza że dana struktura w danym widmie nie występuje, lub jest bardzo słabo zarysowana.

MDAAQ30 oraz MDAA15 i MDAAQ15. Zaobserwowano przesunięcie położenia krawędzi absorpcji o mniej niż 0.5eV w kierunku niższych energii dla roztworów z chlorochiną. Poza tym stosunek amplitudy maksimum krawędzi do amplitudy XANES powyżej 7160eV jest nieco mniejszy dla roztworu z chlorochiną w tych parach a w szczególności dla MDAA15 i MDAAQ15. Wskazuje to najprawdopodobniej na zmianę wzajemnych położenia atomów stref węgla w FePPIX. Zmiany te są jednak znacznie mniejsze niż pomiędzy widmem meso-hematyny i hematyny wskazując na mniejsze różnice strukturalne. Ze względu na podobieństwo struktury P XANES nie wskazuje na zmiany symetrii wokół absorbującego żelaza, ani na zmianę spinu absorbera w parach roztworów bez i z chlorochiną w roztworach kwasu octowego z dodatkiem wody. Większą różnicę struktury P zanotowano dla pary MDAA i MDAAQ, rys. 5.27, przy jednoczesnym podobieństwie XANES w pozostałym zakresie widma. Różnice w amplitudzie struktury P, która odpowiada za przejście elektronu ze stanu s do s-hybrydyzowanych stanów 3d z 4p w atomie żelaza, pomiędzy XANES MDAA i MDAAQ, w związku z brakiem zmian strukturalnych najbliższego otoczenia atomu żelaza (analiza EXAFS nie wykazała znaczących różnic w parametrach odległości i nieuporządkowania dla atomów azotu i osiowego atomu tlenu), mogą świadczyć o nieco innej symetrii najbliższego otoczenia absorbera - ułożenie katowe.

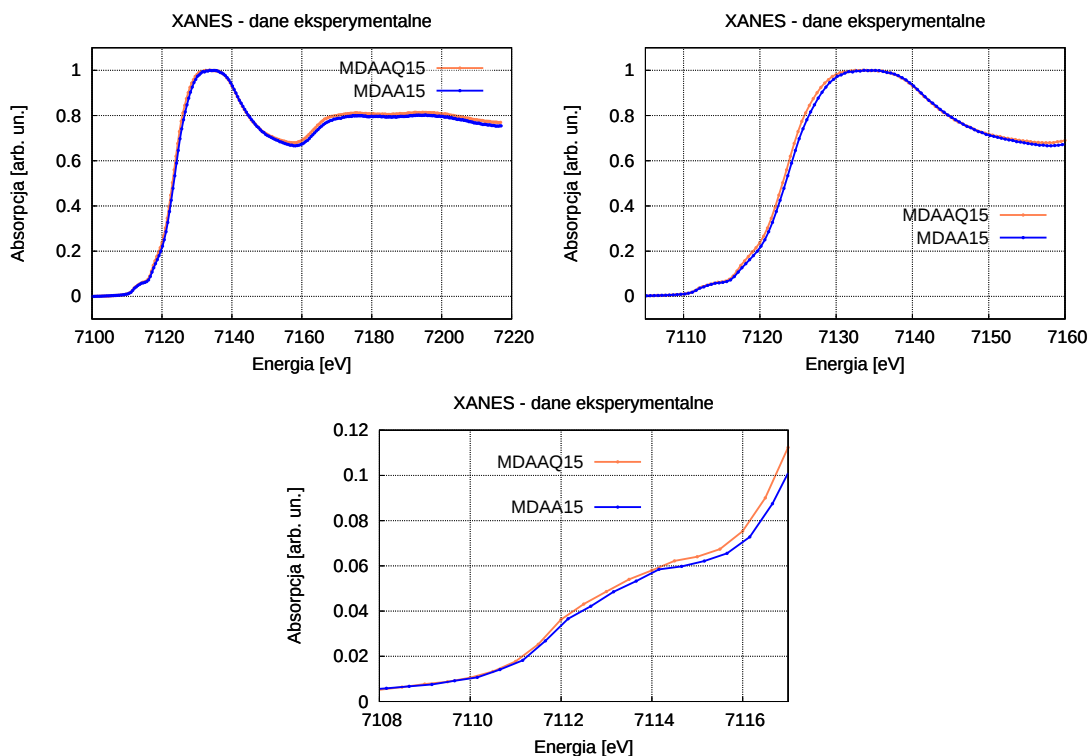
Wykonano również graficzne zestawienie widm XANES dla trzech rodzajów roztworów bez obecności chlorochiny, rys. 5.30, oraz trzech roztworów zawierających antymalaryczne lekarstwo, rys. 5.31. Zarówno w jednym jak i drugim zestawieniu najmniejszy stosunek amplitudy maksimum krawędzi do amplitudy XANES powyżej 7160eV zauważono dla roztworu bez dodatku wody. Widma MDAA oraz MDAAQ są też bardzo nieznacznie przesunięte w kierunku niższych energii w grupach odpowiednio bez i z antymalarycznym lekiem. XANES wskazuje zatem na większe różnice pomiędzy otoczeniem atomu żelaza pomiędzy roztworami bez



Rysunek 5.27. Widma z zakresu XANES dla pary MDAA-MDAAQ.

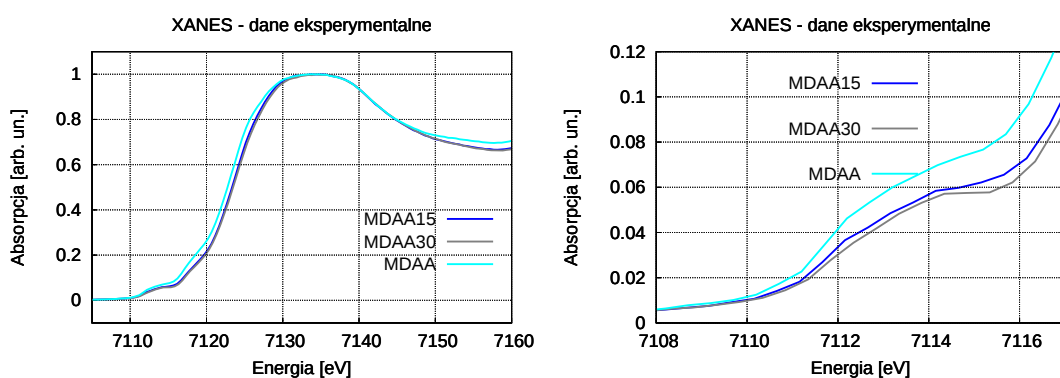


Rysunek 5.28. Widma z zakresu XANES dla pary MDAA30-MDAAQ30.



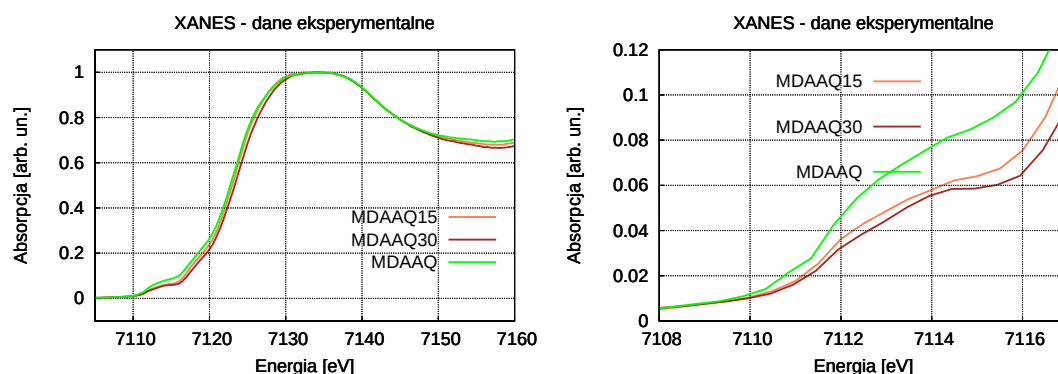
Rysunek 5.29. Widma z zakresu XANES dla pary MDAA15-MDAAQ15.

i z dodatkiem wody, niż pomiędzy roztworami bez i z dodatkiem chlorochininy.



Rysunek 5.30. Porównanie eksperymentalnych widm XANES dla wszystkich roztworów bez obecności chlorochininy.

Dokonano również porównania kształtu XANES dla jednego z widm roztworów - MDAA15 oraz widma XANES zmierzonego dla mikrokrystalicznej próbki meso-hematyny, rys. 5.32. Wybór widma roztworu jest losowy i nie powinien wpłynąć na wnioski wysunięte z porównania, ponieważ kształty wszystkich widm XANES roztworów kwasu octowego są do siebie bardzo podobne. W porównaniu do XANES meso-hematyny w postaci mikrokrystalicznego proszku widmo roztworu ma rozmytą i przesuniętą w kierunku wyższych energii a tym samym głównej krawędzi absorpcji strukturę P (7113eV), wyraźnie zarysowaną strukturę A w

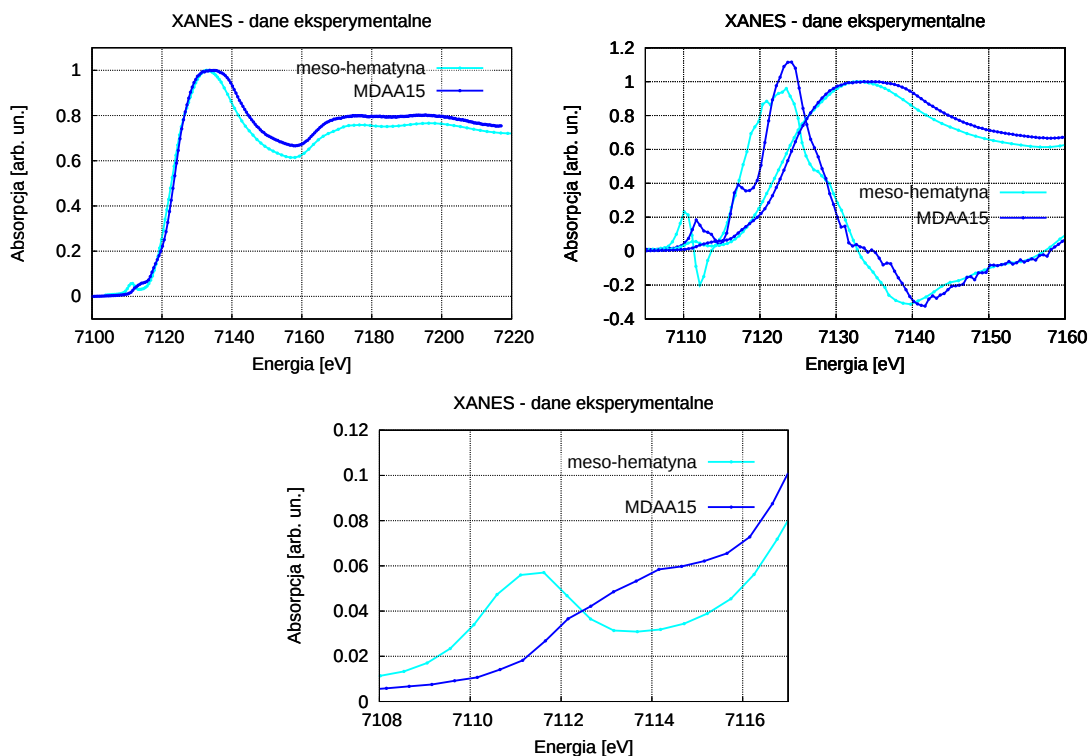


Rysunek 5.31. Porównanie eksperymentalnych widm XANES dla wszystkich roztworów w obecności chlorochiny.

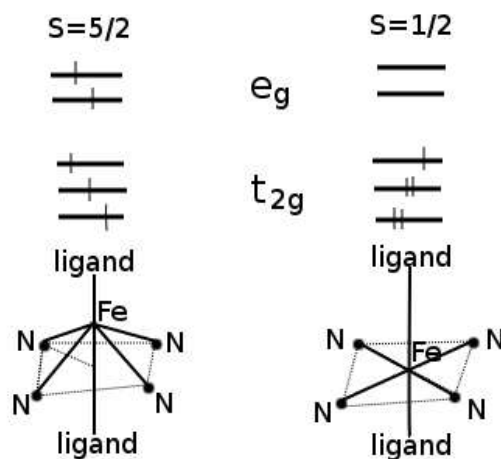
pozycji 7118eV, zanik struktury C, oraz szersze platou D w maksimum absorpcji. Obecność struktury A jest w stosunku do porfiryn z centralnym atomem żelaza, którego ligand stanowią lekkie atomy są oznaką zmiany spinu ze stanu $S=5/2$ do $S=3/2$ wielokrotnie i dla różnych związków opisaną w literaturze [86, 107, 108]. Na szczególną uwagę zasługuje praca Della Longa i in. [90], w której zestawiono kilka niskospinowych i wysokospinowych widm dla żelazowych porfiryn różnych hemo-protein. Dyskutowano tam również wpływ zmiany ligandu żelaza na tę strukturę. Opisane powyżej rezultaty analizy EXAFS widm roztworów potwierdzają znaczne różnice strukturalne dla osiowego atomu tlenu w stosunku do widma proszkowej meso-hematyny. Zatem pojawienie się struktury A w XANES roztworów można tłumaczyć małą wartością liczby koordynacyjnej wskazującej, że co najwyżej jedna trzecia cząsteczek FePPIX posiada ligand. Obecność struktury A wskazuje na zmianę położenia atomu żelaza w kierunku do pierścienia FePPIX (doming effect, rys. 5.33), co jest powiązane ze zmianą funkcji spinowej tego atomu.

Zmiana spinu żelaza jest związana z wystąpieniem tzw. doming effect, rys. 5.33 [109]. W stanie wysokiego spinu żelazo jest poza płaszczyzną pierścienia, natomiast dla spinu niskiego znajduje się w płaszczyźnie. Dla β -hematyny proszkowej, której spin żelaza wynosi $S=5/2$ żelazo znajduje się 0.47Å poza płaszczyzną [37, 110]. Przypuszczalnie tę samą wartość spinu posiada żelazo proszkowej meso-hematyny co potwierdza podobieństwo widma XANES dla tych dwóch materiałów o dime-rowej budowie cząsteczki.

Położenie żelaza bliżej płaszczyzny pierścienia FePPIX w roztworze kwasu octowego potwierdza również zanik struktury C, ponieważ atomy na których ma miejsce wielokrotne rozpraszanie są bardziej kolinearne. Skrócenie odległości żelaza w kierunku do płaszczyzny pierścienia powoduje skrócenie odległości między absorberem a atomami strefy czterech atomów azotu pierścienia na co wskazuje również porównanie parametrów uzyskanych z analizy widm EXAFS dla meso-hematyny proszkowej i w roztworze, tab. 5.14. Przesunięcie położenia struktury P o 2eV w kierunku wyższych energii w XANES meso-hematyny w kwasie w stosunku do jej położenia w widmie meso-hematyny proszkowej to prawdopodobnie również efekt krótszego wiązania Fe - atomy azotu w pierścieniu PPIX, wynikającego z braku ligandu tlenowego. Publikacja T. Yamamoto [111] wskazuje na wyższą energię przejścia elektronu 1s do orbitalu a_1 przy skróconych wiązaniach



Rysunek 5.32. Widma z zakresu XANES oraz jego pochodna dla przykładowego widma roztworu - MDAA15 w zestawieniu z widmem i jego pochodna dla meso-hematyny w postaci proszku.

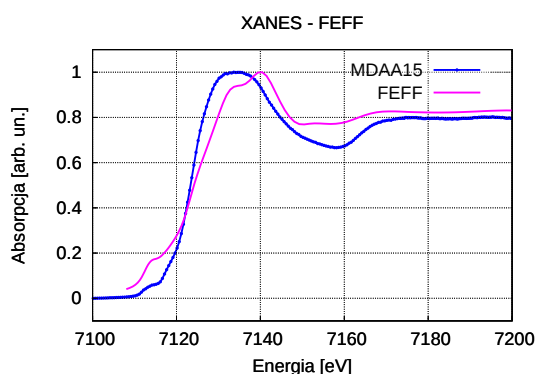


Rysunek 5.33. Zależność spinu żelaza od położenia w stosunku do płaszczyzny pierścienia PPIX.

dla czterech atomów w płaszczyźnie, dla molekuły o symetrii O_h , potwierdzając tym samym przypuszczalny spin dla cząsteczki. W pracy H. Oyanagi [109] pokazano widmo niskospinowej mioglobiny z żelazem dwuligandowym z podobnie bliskim położeniem P do krawędzi absorpcji. Przypisano to shybrydyzowaniu orbitalu p z orbitalem $d_{x^2-y^2}$. Każde z charakterystycznych struktur widma jest potwierdzone przez maksima na pochodnej widma XANES, które dla roztworu

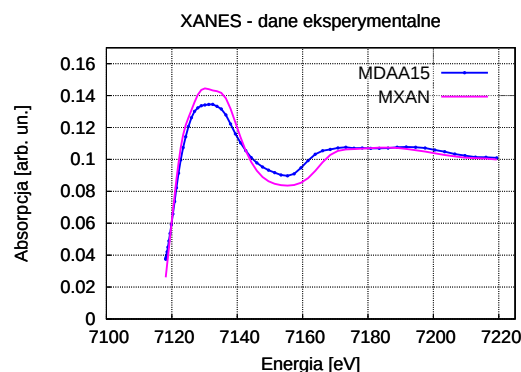
znajdują się w następujących pozycjach energetycznych: 7111eV, 7115eV, 7117eV, 7121eV, 7124eV - pozycja głównej krawędzi absorpcji, 7127eV i 7135eV.

Ponieważ widma XANES roztworów z obecnością cząsteczek chlorochininy i bez ich obecności w roztworze nie wykazują znaczących różnic postawiony problem przy obliczaniu i dopasowywaniu XANES nie był taki, jak przy analizie EXAFS: czy a jeśli tak, to w jaki sposób różni się otoczenie żelazowego absorbera przed i po dodaniu chlorochininy w roztworach kwasu octowego z różną zawartością H_2O . Pytanie przy analizie XANES brzmiało: **czy bardziej do eksperymentalnego XANES FePPIX w roztworze kwasu octowego podobne jest teoretyczne widmo na podstawie modelu bez uwzględnienia atomu tlenu osiowego czy też obecność tego atomu należy uwzględnić a jeżeli tak to w jakiej odległości od absorbera?**. Do obliczenia teoretycznego XANES na podstawie odpowiednio zmodyfikowanej jednostki strukturalnej wykorzystano, tak jak i dla analizowanych poprzednio mikrokrystalicznych proszków, programów FEFF i MXAN. Dodatkowo podjęto próbę dopasowania widma XANES używając do tego programu MXAN. Zarówno do dopasowania jak i zestawienia z teoretyczną funkcją XANES użyto przykładowego eksperymentalnego widma roztworu MDAA15. Wybór był losowy. W dopasowaniach XANES nie jest brany pod uwagę parametr nieuporządkowania strukturalnego a zatem przyjmuje się, że cząsteczki danego materiału mają jednorodną budowę. Teoretycznie policzony XANES za pomocą programu FEFF oraz dopasowane teoretyczne widmo XANES przez MXAN dla modelu bez obecności osiowego tlenu przedstawiono odpowiednio na rys. 5.34 i rys. 5.35. Parametry dopasowania przedstawiono w tab. 5.15. Teoretycznie policzony i dopasowany XANES według opisanej w poprzednim rozdziale strategii przy użyciu programu MXAN dla zróżnicowanych ze względu na odległość żelazo - tlen osiowy modeli przedstawiono na rys. 5.36, natomiast parametry dopasowania zestawiono w tab. 5.16.



Rysunek 5.34. Teoretyczne widmo XANES obliczone przez program FEFF dla modelu jednostki strukturalnej wyznaczonej przez dopasowanie EXAFS bez uwzględnienia osiowego atomu tlenu.

Najlepszy parametr jakości dopasowania w analizie XANES przez MXAN uzyskano dla modelu struktury z tlenem pochodzącym z cząsteczki roztworu w odległości 2.85Å bez obecności tlenu osiowego. Parametr ten wynosi 0.289 i jest o



Rysunek 5.35. Teoretyczne widmo XANES obliczone i dopasowane do przykładowego eksperymentalnego XANES dla roztworu dla modelu strukturalnego bez obecności osiowego atomu tlenu. Do analizy wykorzystano program MXAN.

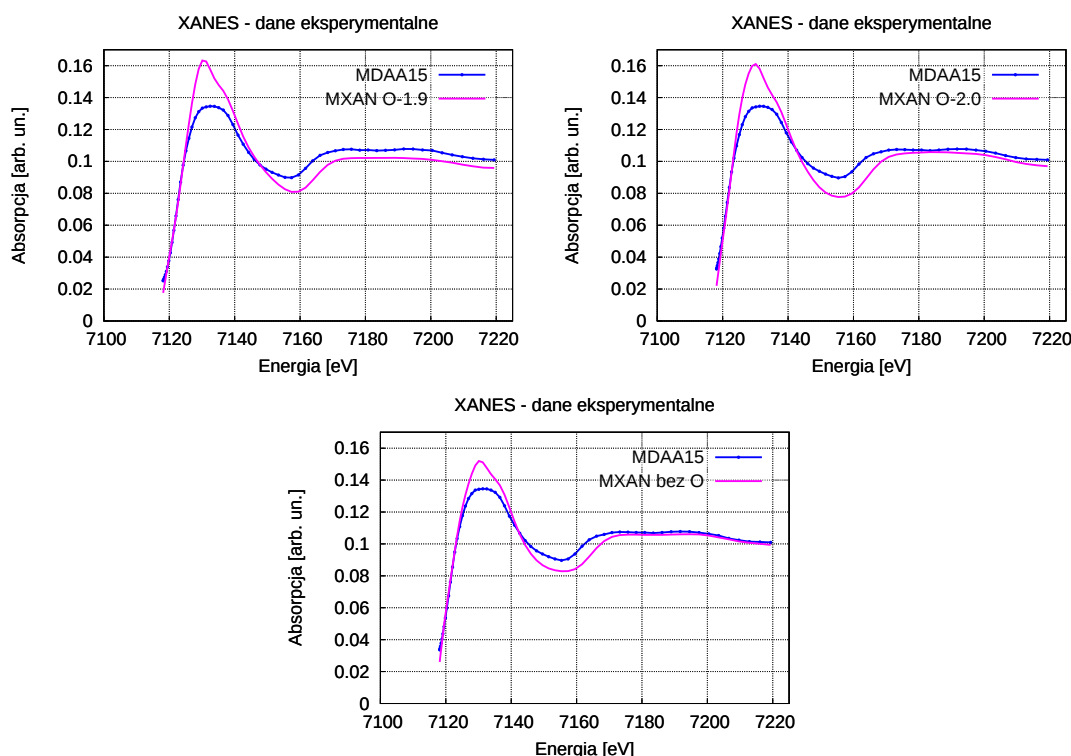
	MDAA15
S^2	0.289
X	$r(\text{Fe-X})$ [Å]
O os.	-
N_1	2.04
N_2	2.05
N_3	2.06
N_4	2.06
O_1 p.p. d.	2.83

Tabela 5.15. Parametry dopasowania XANES roztworu dla modelu jednostki strukturalnej pojedynczego pierścienia FePPIX bez osiowego atomu tlenu.

	O-1.9	O-2.0	bez O
S^2	0.836	0.787	0.344
X	$r(\text{Fe-X})$ [Å]	$r(\text{Fe-X})$ [Å]	$r(\text{Fe-X})$ [Å]
O os.	1.90	2.01	-
N_1	2.03	2.03	2.04
N_2	2.03	2.04	2.05
N_3	2.06	2.07	2.05
N_4	2.08	2.08	2.06

Tabela 5.16. Parametry dopasowania XANES roztworu dla modelu jednostki strukturalnej z następującymi odległościami tlenu: 1.9Å O-1.9, 2.0Å O-2.0, oraz bez obecności tlenu - bez O.

0.055 lepszy niż dla modelu bez uwzględnienia jakiegokolwiek atomu pozapierścieniowego, o 0.498 lepszy niż w modelu z osiowym tlenem w odległości 2.01Å i o 0.547 lepszy niż w modelu z osiowym tlenem w odległości 1.90Å. Analiza XANES przychyliła się zatem do potwierdzenia modelu jednostki strukturalnej otrzymanej w analizie EXAFS i potwierdza model struktury związku FePPIX z co najwyżej jedną trzecią pierścieni z atomem żelaza posiadającym ligand.



Rysunek 5.36. Teoretyczne widmo XANES obliczone i dopasowane do przykładowego eksperymentalnego XANES dla roztworu dla modelu jednostki strukturalnej z następującymi odległościami osiowego tlenu od absorbera: 1.9Å oznaczony jako MXAN O-1.9, 2.0Å oznaczony MXAN O-2.0, oraz bez obecności tlenu - MXAN bez O. Do analizy wykorzystano program MXAN.

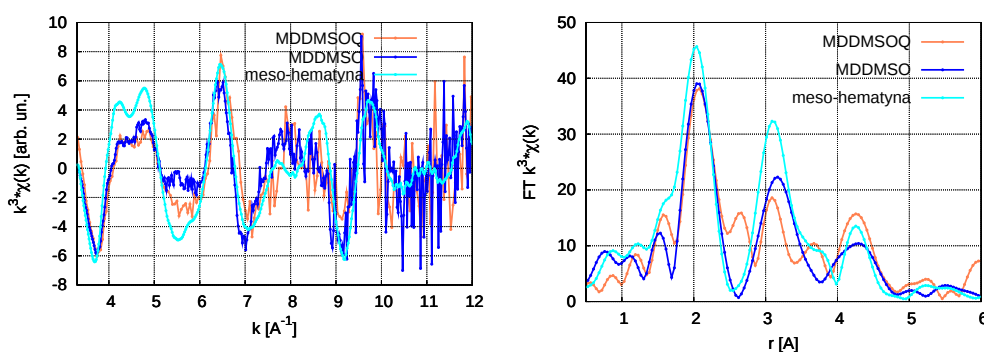
5.2.2 Roztwory dimetylosulfotlenku

Drugi z roztworów wykorzystanych w badaniach techniką XAFS - dimetylosulfotlenek ($(\text{CH}_3)_2\text{SO}$) jest podobnie jak kwas octowy substancją o cząsteczkach polarnych jednak w przeciwieństwie do kwasu octowego jego cząsteczki nie są donarami jonów wodorowych. Grupy metylowe cząsteczki DMSO mogą wykazywać bardzo słaby charakter kwasowy: $\text{pK}_a = 35$. Dimetylosulfotlenek został wybrany jako rozpuszczalnik ponieważ ma obojętny w charakter i przestają być w nim istotne efekty dysocjacji w rozumieniu wymiany jonów wodorowych. Ponieważ jako rozpuszczalnika meso-hematyny używano dimetylosulfotlenku bez żadnego dodatku wody nie można brać pod uwagę hydrofobowości FePPIX jako czynnika powodującego lub stabilizującego kompleks cząsteczki meso-hematyny z chlorochiną.

Analiza widm EXAFS

Eksperymentalne widma EXAFS wraz z ich transformatami Fouriera dla pary widmo bez i z chlorochinina w roztworze dimetylosulfotlenku - DMSO, umieszczono na rys. 5.37. Dla tego samego zakresu EXAFS jak i transformaty Fouriera EXAFS dołączono widma proszkowej meso-hematyny. Różnice dla funkcji $\chi(k)$ (rys. 5.37) pomiędzy MDDMSO a MDDMSOQ są widoczne w następujących za-

kresach: $4\text{--}6\text{\AA}^{-1}$ i $6.5\text{--}8\text{\AA}^{-1}$. W zakresie $4\text{--}6\text{\AA}^{-1}$ i $7\text{--}9\text{\AA}^{-1}$ oba widma roztworów wyraźnie odbiegają od funkcji EXAFS dla meso-hematyny. Natomiast w zakresie $6.5\text{--}7\text{\AA}^{-1}$ funkcja $\chi(k)$ dla MDDMSO pokrywa się z tą dla meso-hematyny, gdy tymczasem ta dla MDDMSOQ jest wyraźnie przesunięta w kierunku wyższych wartości wektora falowego k , co świadczy o zmianie odległości atomów już w pierwszej strefie koordynacyjnej. Transformaty Fouriera dla wszystkich trzech widm: MDDMSO, MDDMSOQ i meso-hematyny różnią się dla każdej z atomowych stref koordynacyjnych. Zmiany w każdym z pików transformaty wskazują na zmianę odległości od żelazowego absorbera, oraz wzrost nieuporządkowania strukturalnego dla strefy czterech atomów azotu oraz węgla typu C_α w roztworach MDDMSO i MDDMSOQ w porównaniu do mikrokryształicznej meso-hematyny. Pojawia się dodatkowa struktura w zakresie $2.4\text{--}2.9\text{\AA}$ w TF widma MDDMSOQ sugerując obecność dodatkowego lub dodatkowych atomów w takiej odległości od żelaza.



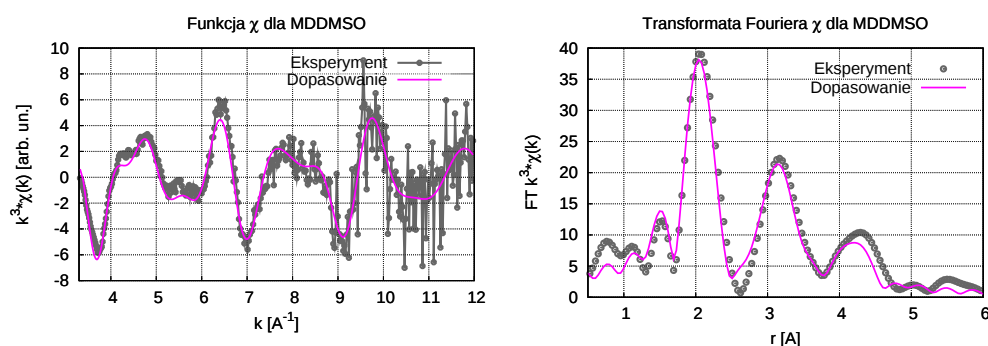
Rysunek 5.37. Eksperymentalne funkcje $\chi(k)$ dla MDDMSO i MDDMSOQ oraz ich transformaty Fouriera w zestawieniu z funkcją $\chi(k)$ dla meso-hematyny

W tab. 5.17 zamieszczono parametry dopasowania funkcji $\chi(k)$ dla roztworu MDDMSO i MDDMSOQ. W przeciwieństwie do roztworów kwasu octowego funkcja EXAFS może zostać dopasowana poprzez model jednostki strukturalnej dla cząsteczki dimerowej. Oznacza to, że liczba koordynacyjna osiowego atomu tlenu pozostaje bliska wartości 1, a zatem atom ten nie podlega wymianie z atomami tego samego rodzaju z otoczenia, cząsteczka jest stabilna i osiowy atom tlenu najprawdopodobniej pozostaje wciąż związany w cząsteczce dimerowej. Dla roztworu MDDMSO dopasowano wyłącznie model strukturalnej jednostki dla dimeru, natomiast w przypadku roztworu MDDMSOQ konieczne okazało się uwzględnienie dodatkowych atomów.

Istotna zmiana parametrów pierścienia FePPIX po dodaniu antymalarycznego lekarstwa dotyczy skrócenia odległości czterech atomów azotu o $0.023\text{\AA}$ i skrócenia odległości w strefie węgla typu C_{meso} o $0.11\text{\AA}$. Liczba koordynacyjna tlenu osiowego oraz atomów pozapierścieniowych tworzących wraz z tlenem wiązanie mostkowe nie jest istotnie różna dla obydwu roztworów. To samo dotyczy wartości parametru odległości atomów wiązania mostkowego za wyjątkiem C_2 p.p. którego odległość od absorbera wzrasta o $0.5\text{\AA}$. Stąd wniosek o zachowaniu dimerowej budowy cząsteczki zarówno w roztworze bez antymalarycznego leku jak i w jego obecności. Wartość czynnika Debye-Wallera dla osiowego tlenu wskazuje jednak na większy nieporządek strukturalny w strefie tego atomu w cząsteczkach po do-

	MDDMSO			MDQDMSO		
R	51.88			53.69		
FI	0.00155			0.00253		
EF	-3.0 ± 0.7			-3.0 ± 0.7		
X	N(X)	r(Fe-X) [Å]	$2\sigma^2(X)$ [Å ²]	N(X)	r(Fe-X) [Å]	$2\sigma^2(X)$ [Å ²]
O ₁ os.	1	1.78 ± 0.01	0.007 ± 0.003	0.96 ± 0.04	1.80 ± 0.02	0.012 ± 0.004
N ₁₂₃₄	4	2.083 ± 0.006	0.010 ± 0.002	4	2.06 ± 0.01	0.013 ± 0.003
C _α	8	3.09 ± 0.01	0.011 ± 0.003	8	3.08 ± 0.02	0.011 ± 0.004
C _{meso}	4	3.51 ± 0.05	0.013 ± 0.009	4	3.40 ± 0.06	0.015 ± 0.006
C _β	8	4.28 ± 0.04	0.020 ± 0.013	8	4.30 ± 0.07	0.018 ± 0.008
C ₁ p.p.	1	3.09 ± 0.16	0.011 ± 0.003	0.96 ± 0.04	3.17 ± 0.12	0.011 ± 0.004
C ₂ p.p.	1	3.45 ± 0.34	0.010 ± 0.008	0.96 ± 0.04	4.01 ± 0.38	0.018 ± 0.008
O p.p	1	3.90 ± 0.09	0.010 ± 0.008	0.96 ± 0.04	4.01 ± 0.18	0.018 ± 0.008
N ₁ p.p. d.	-	-	-	1.10 ± 0.05	2.48 ± 0.06	0.002 ± 0.001
C ₁ p.p. d.	-	-	-	1.01 ± 0.08	2.88 ± 0.06	0.002 ± 0.001
C ₂ p.p. d.	-	-	-	0.98 ± 0.08	2.89 ± 0.06	0.002 ± 0.001
C ₃ p.p. d.	-	-	-	6.31 ± 0.13	3.60 ± 0.07	0.014 ± 0.003
O/N ₁ p.p. d.	-	-	-	2.94 ± 0.10	3.77 ± 0.09	0.004 ± 0.002

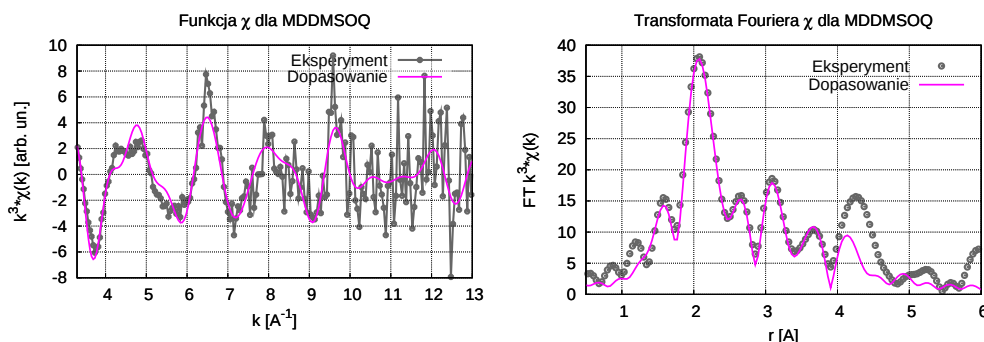
Tabela 5.17. Parametry dopasowania dla atomów i ich grup w strukturze ferriprotoporfiryny FePPIX dla roztworów meso-hematyny w DMSO.



Rysunek 5.38. Funkcja $\chi(k)$ wraz z funkcją dopasowaną dimerowej jednostki strukturalnej dla MDDMSO, oraz ich transformaty Fouriera.

daniu antymalarycznego leku. Zidentyfikowanie pozapierścieniowego atomu azotu w odległości 2.48Å , dwóch atomów węgla w odległości 2.88Å oraz dodatkowych atomów węgla i tlenu bądź azotu w odległości powyżej 3.5Å jest mocną przesłanką do potwierdzenia wiązania atomów cząsteczki chlorochininy z pierścieniem FePPIX. Graficzne przedstawienie funkcji $\chi(k)$ wraz z funkcją dopasowaną, oraz ich transformaty Fouriera zamieszczono na rys. 5.38 dla MDDMSO i rys. 5.39 dla MDDMSOQ.

W plikach banku danych PDB dla krystalograficznie wyznaczonych struktur porfiryn z żelazem posiadającym jako ligand atom azotu wbudowany w pierścień aromatyczny, jak np. histydyna (ligand hemu w strukturze hemoglobiny) nie znaleziono wartości odległości żelazo - azot w granicach 2.5Å . Na ogół nie są one większe niż 2.25Å . Trudno zatem określić charakter wiązania atomu N chlorochininy z centralnym absorbującym żelazem. Odległość 2.88Å od atomu żelaza dwóch atomów węgla, jeśli są one związane w ten sam pierścień co atom azotu świadczy o położeniu płaszczyzny części aromatycznej chlorochininy pod kątem zdecydowanie mniejszym niż 90 stopni w stosunku do płaszczyzny pierścienia porfiryнового. A zatem pierścienie aromatyczne chlorochininy i FePPIX byłyby do siebie w pewnym stopniu równoległe co potwierdzałoby przewidywane



Rysunek 5.39. Funkcja $\chi(k)$ wraz z funkcją dopasowaną dimerowej jednostki strukturalnej dla MDDMSOQ, oraz ich transformaty Fouriera.

dla kompleksu FePPIX-chlorochinina wiązanie typu $\pi - \pi$. Analiza EXAFS wyklucza charakter dimerowej cząsteczki meso-hematyny w roztworze dimetylosulfotlenku jako μ -oxo dimeru zarówno w obecności chlorochininy jak bez niej. Gdyby cząsteczka meso-hematyny miała formę μ -oxo dimeru w strukturze atomowej najbliższy atom żelaza do atomu żelaza absorbującego znajdowałby się w odległości około 3.6-4.0 Å. Taki model strukturalny według analizy EXAFS okazał się nieprawdziwy zarówno dla MDDMSO jak i MDDMSOQ. Doniesienia o wiązaniu μ -oxo dimeru z chlorochiną pojawiły się w literaturze, [21, 112]. W analizie EXAFS dla roztworu meso-hematyny w obecności chlorochininy zaproponowano również jako prawdopodobny model z atomem chloru w odległości około 2.7 Å. Został on jednak uznany za znacznie mniej prawdopodobny niż przedstawiony powyżej ze względu na wartość parametru dopasowania $R=73$ a następnie odrzucony po analizie widma XANES.

W dodatkowym zestawieniu, tab. 5.18, zamieszczono porównanie parametrów dopasowania funkcji EXAFS widm roztworów meso-hematyny rozpuszczonej w dimetylosulfotlenku i meso-hematyny proszkowej. Wpływ roztworu przejawia się przede wszystkim w skróceniu znacząco odległości osiowego tlenu o 0.12 Å i w ramach niepewności dopasowania pozostałych atomów tworzących wiązanie mostkowe. Występuje zatem najprawdopodobniej zmiana położenia względem siebie pierścieni FePPIX tworzących dimerową cząsteczkę. Zmiana ta jednak jest na tyle mała, że nie powoduje zerwania wiązań mostkowych. Kolejna zmiana w roztworze dotycząca atomów pierścienia FePPIX to ujednolicenie odległości wiązania czterech atomów azotu i jej wzrost o 0.011 Å z jednoczesnym wzrostem wartości nieuporządkowania dla tej strefy. Brak szóstego ligandu jest dowodem przemawiającym na korzyść zachowania dimerowej budowy cząsteczki. Takim samym dowodem jest brak atomu siarki w odległości do 4.0 Å. Nie ma zatem wymiany osiowego atomu tlenu z tlenem cząsteczki DMSO jak również cząsteczka DMSO nie przyłącza się jako drugi ligand. Należy dodać, że stwierdzono taką wymianę ligandu w hematynie (związku o cząsteczce złożonej z pojedynczego pierścienia FePPIX). W ogólności możliwe jest też dołączenie cząsteczki DMSO jako kolejnego ligandu [106, 113].

Dimerowa cząsteczka meso-hematyny zachowuje się zdecydowanie inaczej w kwasie octowym i dimetylosulfotlenku. W kwasie octowym rozpada się na po-

	MDDMSO	meso-hematyna
R=	51.88	27.85
FI=	0.00155	0.00007
r(Fe-O ₁)	1.78 ±0.01	1.90±0.02
r(Fe-N ₁)	2.083 ±0.006	2.058±0.009
r(Fe-N ₂)	2.083	2.065±0.009
r(Fe-N ₃)	2.083	2.077±0.009
r(Fe-N ₄)	2.083	2.088±0.009
r(Fe-C _α)	3.09x8 ±0.01	3.088±0.007
		3.095±0.007
r(Fe-C _{meso})	3.51x4 ±0.05	3.46x4±0.01
r(Fe-C _β)	4.28x8 ±0.04	4.27±0.03
r(Fe-C _β)		4.30±0.04
r(Fe-C ₁ p.p.)	3.09±0.16	3.06±0.07
r(Fe-C ₂ p.p.)	3.45±0.34	3.72±0.07
r(Fe-O p.p.)	3.90±0.09	4.05±0.03
2σ ² (O ₁)	0.007±0.003	0.012±0.002
2σ ² (4N)	0.010±0.002	0.0073±0.0005
2σ ² (C _α)	0.011±0.003	0.007±0.001
2σ ² (C _{meso})	0.013±0.009	0.009±0.002
2σ ² (C _β)	0.020±0.013	0.021±0.006
2σ ² (C ₁ p.p.)	0.011±0.003	0.007±0.001
2σ ² (C ₂ p.p.)	0.010±0.008	0.010±0.006
2σ ² (O p.p.)	0.010±0.008	0.010±0.006

Tabela 5.18. Parametry dopasowania dla MDDMSO i meso-hematyny. Porównanie.

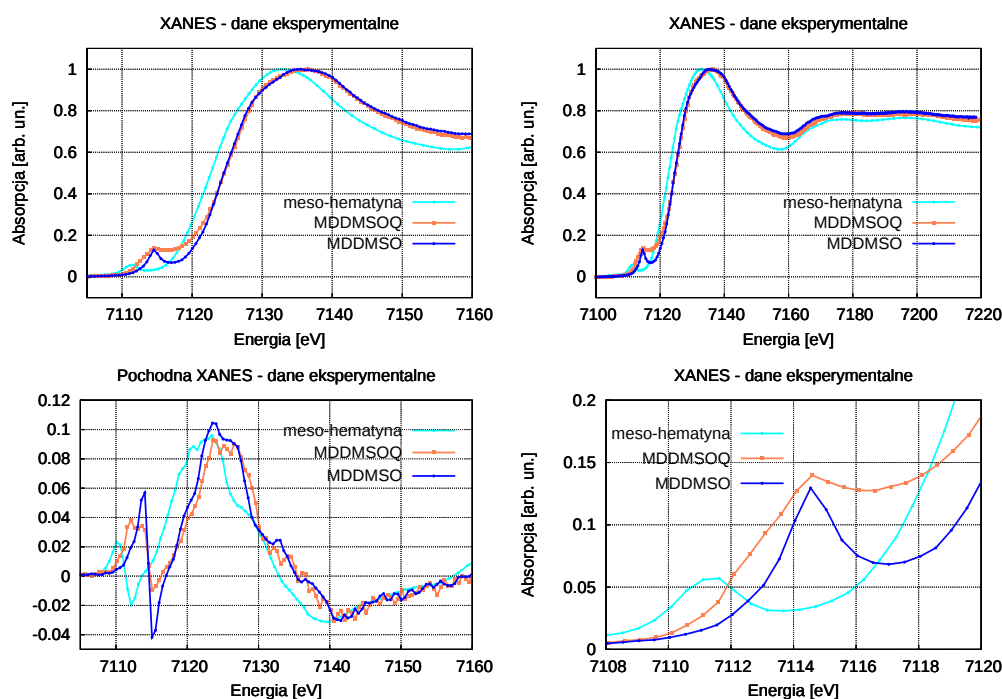
jedyncze pierścienie FePPI podczas gdy w DMSO pozostaje dimerem. Trudno ocenić czy ta różnica jest spowodowana zmianą pH, czy też podobieństwem cząsteczki kwasu octowego do części wiązania mostkowego. Aby stwierdzić jak mogą się wiązać cząsteczki chlorochininy w wakuoli pasożyta należałoby badać wyekstrahowane bezpośrednio z komórki erytrocytu dimery i monomery FePPIX po zastosowaniu lekarstwa antymalarycznego.

Analiza widm EXAFS MDDMSO i MDDMSOQ wskazuje na powstanie kompleksu dimer FePPIX - chlorochinina co daje podstawę, by sadzić, że lek blokuje odkładanie się dimerowych cząsteczek w mikrokryształ. Jest to inne działanie tego samego leku niż zaproponowane na podstawie analizy roztworów kwasu octowego.

Analiza widm XANES

Widma z zakresu XANES dla roztworu DMSO pokazano na rys. 5.40. Różnice w zakresie XANES w widmach MDDMSO i MDDMSOQ są niewielkie za wyjątkiem struktury przedkrawędziowej. Zarejestrowano bardziej rozmytą, lecz o tej samej amplitudzie co dla MDDMSO strukturę P dla MDDMSOQ, co świadczy o delokalizacji stanów shybrydyzowanych prawdopodobnie ze względu na obecność dodatkowych atomów pozapierścieniowych (analiza EXAFS dla MDDMSOQ). Struktura P w widmie roztworów ma około dwukrotnie wyższą amplitudę od odpowiadającej jej struktury dla mikrokryształicznej meso-hematyny, co świad-

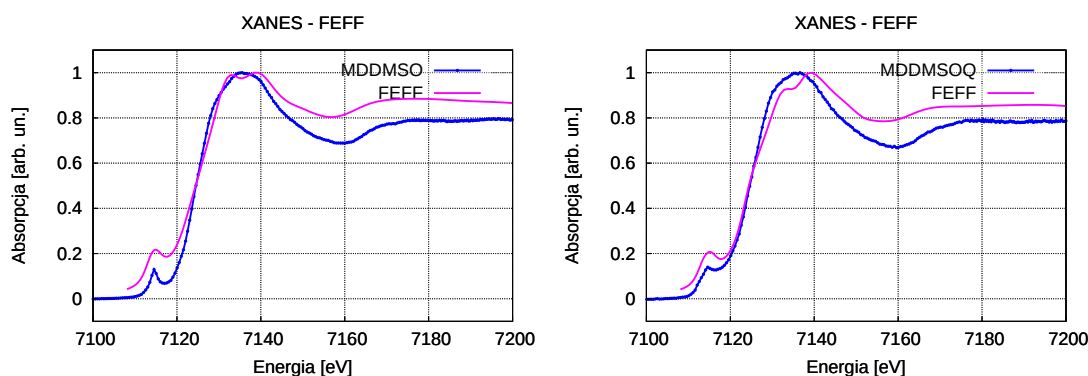
czy prawdopodobnie o zmienionej symetrii wokół centralnego absorbera - zwiększa się liczba shybrydyzowanych stanów 3d z 4p, rys. 5.40 w roztworach w stosunku do materiału meso-hematyny. Zaobserwowano bardzo niewielkie różnice w widmie w zakresie powyżej 7150eV, gdzie widmo MDDMSOQ charakteryzuje się nieco większą intensywnością głównej krawędzi absorpcyjnej niż widmo MDDMSO. XANES obu roztworów różni się też w zakresie 7129-7136eV. Charakterystyczne struktury dla XANES MDDMSO pojawiają się dla energii około: 7114.5eV, 7129eV, 7135eV, 7138.5eV, a dla pochodnej tego widma w okolicach: 7112eV, 7114eV, 7117eV, 7119.5eV, 7125eV - określa położenie głównej krawędzi absorpcji, 7133eV i 7137.5eV. Dla XANES MDDMSOQ jest ich mniej i występują w okolicach: 7114.5eV, 7130eV i 7136eV a dla jego pochodnej w okolicach: 7112eV, 7113.5eV, 7117eV, 7120eV i 7125eV - wyznacza położenie głównej krawędzi absorpcji. Pomimo tych różnic występują charakterystyczne struktury C i D dla widm obydwu roztworów. Podobnie jak dla XANES proszkowej meso-hematyny brak struktury A, co pozwala na założenie spinu o wartości $S=5/2$. Krawędź absorpcji w widmie XANES roztworów jest przesunięta w kierunku wyższych energii w porównaniu z położeniem krawędzi meso-hematyny proszkowej o ~ 2 eV, co pozwala stwierdzić, że wzrasta stopień utlenienia żelazowego absorbera. Jednocześnie nie występuje przesunięcie głównej krawędzi absorpcyjnej MDDMSOQ w stosunku do położenia krawędzi XANES dla MDDMSO, a względne położenie struktury P do położenia głównej krawędzi absorpcji jest takie samo w widmach XANES roztworów i mikrokrystalicznego materiału.



Rysunek 5.40. Eksperymentalne funkcje XANES dla MDDMSO i MDDMSOQ oraz ich pochodne w zestawieniu z funkcją XANES dla meso-hematyny.

W związku z brakiem tak dużych wątpliwości jak dla roztworów w kwasie octowym co do określenia odległości od absorbera atomu osiowego tlenu, oraz jego

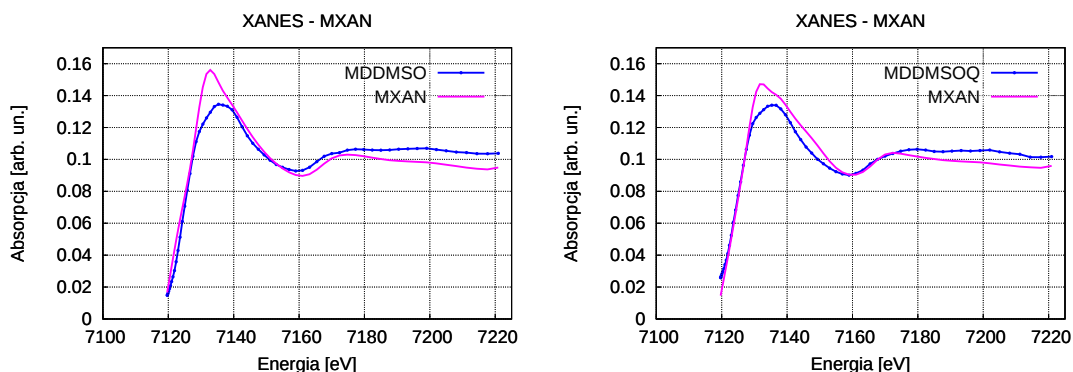
mieszczącej się w przedziale dla struktury cząsteczki dimerowej wartości czynnika Debya-Wallera, teoretyczne funkcje XANES zostały policzone za pomocą kodu FEFF na podstawie pozycji poszczególnych atomów dla uzyskanych w procedurze dopasowania strukturalnych modeli jednostki dla roztworu z dodatkiem i bez obecności chlorochininy. Przedstawiono je na rys. 5.41. Odtwarzają one kształt XANES ze struktura przejścia 1s-3d oraz energetycznym położeniem krawędzi dla obu roztworów MDDMSO i MDDMSOQ. Nie oddają jednak dobrze amplitudy krawędzi absorpcji w stosunku do widma powyżej 7140 eV ani dla roztworu z chlorochinina ani dla tego bez niej. Obliczona teoretyczna funkcja XANES dla MDDMSOQ różni się od tej obliczonej dla MDDMSO przede wszystkim niższą amplitudą struktury C.



Rysunek 5.41. Teoretyczne widmo XANES obliczone przez program FEFF dla modelu jednostki strukturalnej dimerowej cząsteczki uzyskanej po dopasowaniu widma EXAFS roztworu dimetylosulfotlenku w zestawieniu z XANES eksperymentalnym dla MDDMSO i MDDMSOQ.

Dopasowania XANES zostały wykonane programem MXAN dla widm XANES obydwu roztworów, bez i z dodatkiem chlorochininy, zgodnie ze strukturą otrzymaną przy dopasowywaniu EXAFS. Nie dopasowywano regionu przejścia 1s-3d. Dopasowana funkcje przedstawiono na rys. 5.42 a parametry dopasowania w tab. 5.19. Przez graficzne porównanie obydwu dopasowań, rys. 5.42, można podobnie jak dla funkcji obliczonych przez FEFF stwierdzić różnice w strukturze C: dla MDDMSO amplituda struktury C jest mniejsza.

Oba czynniki jakości dopasowania są na akceptowalnym poziomie jednak model strukturalny określony dla MDDMSOQ wydaje się być lepszy. Parametry odległości w dopasowaniu XANES dla czterech atomów azotu w pierścieniu FePPIX roztworu MDDMSO wykazują tendencje do asymetrii w pierścieniu PPIX co jest sprzeczne z wynikami uzyskanymi z analizy EXAFS, jednak ich średnia jest większa od średniej dla odległości tych samych atomów w pierścieniu FePPIX roztworu MDDMSOQ co potwierdza rezultat analizy EXAFS. Dopasowanie zaproponowanego modelu strukturalnego z atomem chloru, należącym do cząsteczki chlorochininy, w odległości 2.26 Å, tak jak ma to miejsce w strukturze meso-heminy, tab. 5.9, do widma MDDMSOQ przesunęło atom chloru na odległość 2.65 Å. Nie uznano jednak tego modelu ze względu na nieakceptowalnie wysoką wartość $S^2 = 1.4$



Rysunek 5.42. Teoretyczne widmo XANES obliczone i dopasowane przez program MXAN do widma eksperymentalnego XANES dla MDDMSO i MDDMSOQ.

	MDDMSO	MDDMSOQ
S^2	0.532	0.438
X	$r(\text{Fe-X}) [\text{\AA}]$	$r(\text{Fe-X}) [\text{\AA}]$
O os.	1.81	1.78
N ₁	2.07	2.06
N ₂	2.07	2.06
N ₃	2.10	2.07
N ₄	2.10	2.07
N p.p. d.		2.49
C p.p. d.		2.85
C p.p. d.		2.88

Tabela 5.19. Parametry dopasowania XANES roztworu dla modelu jednostki strukturalnej cząsteczki dimerowej do eksperymentalnych XANES dla MDDMSO i MDDMSOQ.

5.3 Proponowane otoczenie atomowe dla pierwiastków ciężkich w molekuule fotouczulacza.

Nominalna struktura cząsteczki półproduktu fotouczulacza została przedstawiona w rozdziale 2. Była to molekula protoporfiryny IX bez metalicznego centrum i z dwoma cząsteczkami L-alaniny zamiast grup propylowych. Produktem wyjściowym do produkcji fotouczulacza jest hemina zawierająca atom żelaza i chloru a w procesie przyłączania L-alaniny do cząsteczki PPIX wykorzystuje się brom. Stąd przy nieefektywnych i nieekonomicznych metodach oczyszczania obecność pierwiastków ciężkich żelaza i bromu w niemal gotowym produkcie co wykazała metoda XAFS.

5.3.1 EXAFS

Pierwszą z propozycji umiejscowienia atomu żelaza było centrum pierścienia PPIX, natomiast bromu peryferie pierścienia PPIX - w miejscach wiązania grup propy-

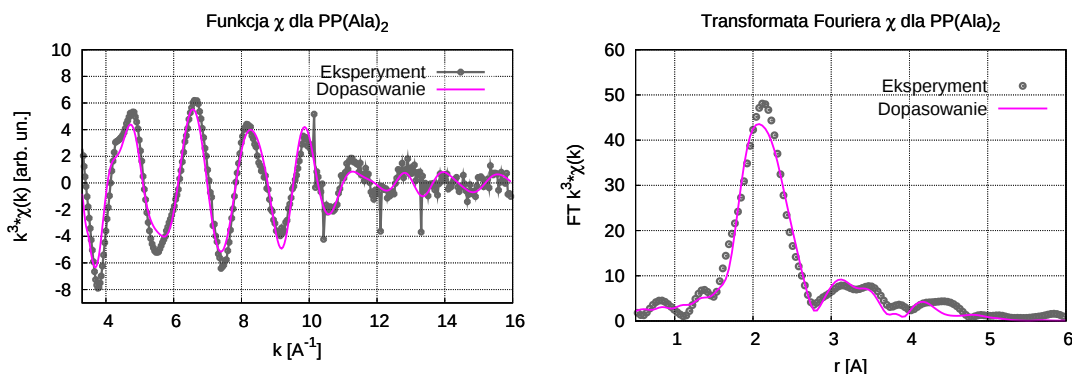
lowych lub jako ligand atomu węgla mostku metinowego.

	PP(Ala) ₂	
	R=26.19 FI=0.00042 EF=-4.0±0.6	
X	r(Fe-X) [Å]	2σ ²
Br os.	2.369±0.004	0.012±0.001
N ₁	1.94±0.01	0.006±0.003
N ₂	2.04±0.03	0.006±0.003
N ₃	2.06±0.04	0.006±0.003
N ₄	2.07±0.03	0.006±0.003
1z8C _α	2.94±0.06	0.013±0.010
2z8C _α	2.99±0.03	0.013±0.010
2z8C _α	3.10±0.05	0.013±0.010
3z8C _α	3.24±0.02	0.013±0.010
C _{meso}	3.32±0.06	0.011±0.008
C _{meso}	3.37±0.06	0.011±0.008
C _{meso}	3.41±0.06	0.011±0.008
C _{meso}	3.42±0.06	0.011±0.008
C _β	4.16±0.08	0.022±0.004
C _β	4.23±0.08	0.022±0.004
C _β	4.25±0.08	0.022±0.004
C _β	4.27±0.08	0.022±0.004
C _β	4.28±0.08	0.022±0.004
C _β	4.34±0.08	0.022±0.004
C _β	4.38±0.08	0.022±0.004
C _β	4.44±0.08	0.022±0.004

Tabela 5.20. Parametry dopasowania odległości i czynników Debya-Wallera dla alani nowej pochodnej.

Model ten jednak okazał się nieprawidłowy a występujące silne oscylacje w szerokim zakresie eksperymentalnego EXAFS dla PP(Ala)₂ jak również duża wartość amplitudy pierwszego pików w porównaniu do kolejnych w transformacie Fouriera zmierzonego widma EXAFS, rys. 5.43, wskazują na silnie rozpraszający atom w bezpośrednim sąsiedztwie absorbującego atomu żelaza.

Dopasowywano zatem model strukturalny protoporfiryny IX z atomem żelaza w centrum pierścienia oraz atomem bromu jako ligandem centralnego żelaza. Parametry dopasowania umieszczono w tab. 5.20. Funkcja $\chi(k)$ dopasowana do eksperymentalnej funkcji EXAFS została przedstawiona na rys. 5.43. Przedstawione dopasowanie jest modyfikacją dopasowania przedstawionego w artykule autora rozprawy [114]. Modyfikacja została przeprowadzona ze względu na otrzymaną poprzednio zbyt wysoką wartość nieuporządkowania strukturalnego wynoszącą 0.054 dla pierścieniowych atomów węgla typu α , mogącą sugerować brak struktury pierścienia PPIX w otoczeniu atomowym żelaza. Ponieważ dopasowanie było korekcją zmieniono strategię dopasowania parametrów. Dla uzyskania rozsądnej wartości parametru czynnika Debya-Wallera w grupie węgla typu α pogrupowano odpowiednio atomy węgla typu C_α, tab. 5.20 i dopasowywano parametry



Rysunek 5.43. Funkcja $\chi(k)$ EXAFS wraz z funkcją dopasowania dla alaninowej pochodnej PPIX, oraz ich transformaty Fouriera

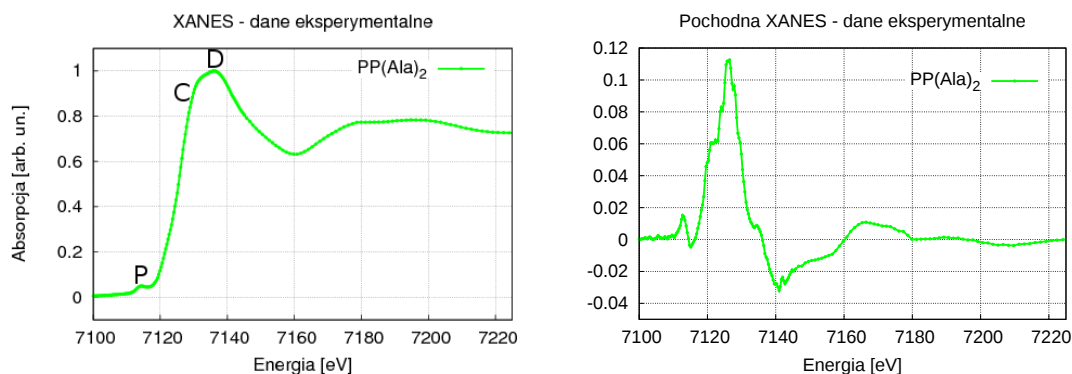
odległości te same w podgrupach C_α . Dopasowywano również parametry odległości dla atomu bromu oraz oddzielnie dla każdego z atomów azotu. Parametry odległości dla węgla typu C_{meso} i C_β pozostały niezmienione w stosunku do opublikowanych parametrów, a jednakowy błąd dopasowania odległości w danej grupie wynika z tego, że podczas procedury dopasowania przesuwano je o tę samą wartość. Wszystkie parametry nieuporządkowania strukturalnego dopasowywano dla grup atomów tego samego rodzaju i w podobnej odległości od absorbera. Teoretyczna funkcja EXAFS na podstawie przyjętego modelu została dopasowana z dobrymi wartościami jakości parametrów R i FI. Pewne wątpliwości mogą budzić nieidealnie odpowiadające sobie kształty transformat Fouriera: funkcji EXAFS eksperymentalnej i dopasowanej, rys. 5.43. Może to być spowodowane tym, że jako ligand żelaza w pewnym procencie cząsteczek półproduktu występuje atom tlenu. Nie zmienia to jednak wniosku z przeprowadzonego dopasowania o zajmowaniu centralnej pozycji w pierścieniu przez atom żelaza ani tego, że atom bromu znajduje się w pozycji jego ligandu.

5.3.2 XANES

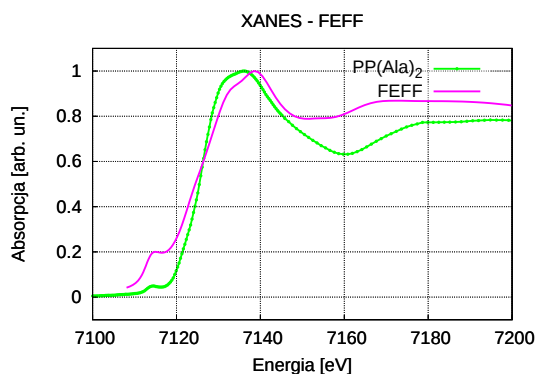
Widmo XANES na krawędzi K żelaza dla $PP(Ala)_2$, rys. 5.44, przypomina kształtem pokazywane dla np. meso-hematyny widma XANES na krawędzi K atomu żelaza umieszczonego w centrum pierścienia PPIX. W odniesieniu do charakterystycznych struktur na widmie XANES meso-hematyny, rys. 5.12 wykazuje obecność pików P z maksimum w ~ 7114 eV, wyraźną strukturę C dla energii ~ 7131 eV co wskazuje na położenie absorbującego żelaza poza płaszczyznę pierścienia, oraz strukturę D w położeniu ~ 7136 eV. Wyodrębniające się maksima w pochodnej XANES zarejestrowano dla następujących pozycji energetycznych: 7113 eV, 7121 eV, 7126 eV - położenie głównej krawędzi absorpcji, 7135 eV.

Teoretyczną funkcję XANES dla $PP(Ala)_2$ policzoną za pomocą FEFF na podstawie modelu strukturalnego otrzymanego przez dopasowanie EXAFS przedstawiono na rys. 5.45. Odtwarza ona kształt każdej z charakterystycznych struktur widma P, C i D.

Na rys. 5.46 przedstawiono teoretyczną funkcję XANES dopasowaną do eksperymentalnego widma przy użyciu programu MXAN. Parametry tego dopasowania

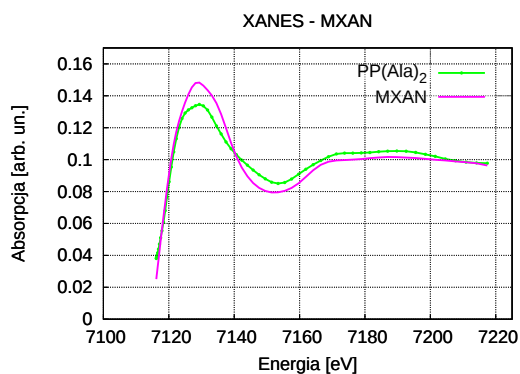


Rysunek 5.44. Funkcja XANES dla alaninowej pochodnej PPIX z zaznaczeniem widocznych struktur P, C i D, oraz jej pochodna



Rysunek 5.45. Funkcja eksperymentalna i teoretyczna XANES dla alaninowej pochodnej PPIX policzona za pomocą FEFF.

przedstawiono w tab. 5.21.



Rysunek 5.46. Funkcja eksperymentalna i teoretyczna XANES dla alaninowej pochodnej PPIX policzona za pomocą MXAN.

Dopasowanie XANES zostało wykonane z parametrem jakości porównywalnym do innych parametrów uzyskanych dla związków o porfirynowej budowie cząsteczki (mikrokryształiczna meso-hematyna). Odległość atomu bromu została dopasowana z podobną wartością co dla analizy EXAFS. Różnice w stosunku do dopasowania

	PPIXALA
S^2	0.358
X	$r(\text{Fe-X}) [\text{\AA}]$
Br os.	2.35
N ₁	2.02
N ₂	2.03
N ₃	2.03
N ₄	2.14

Tabela 5.21. Parametry dopasowania XANES dla widma PP(Ala)₂.

EXAFS pojawiają się dla parametrów odległości w strefie czterech atomów azotu. Najkrótsza odległość atomu azotu jest o 0.08 Å a najdłuższa o 0.07 Å dłuższe w dopasowaniu XANES. Jednak oba dopasowania potwierdzają dużą asymetrię cząsteczki PPIX już w pierwszej strefie koordynacyjnej. Zarówno kształt jak parametry dopasowania XANES potwierdzają prawdziwość przyjętego strukturalnego modelu z atomem żelaza w centrum pierścienia PPIX oraz atomem bromu w pozycji jego ligandu.

Rozdział 6

Podsumowanie

Malaria pomimo stosowanych terapii i środków zapobiegawczych wciąż pozostaje jedną z najczęściej na świecie występujących chorób zakaźnych. Występuje przede wszystkim w krajach strefy tropikalnej i subtropikalnej. Według raportu z 2008 roku Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) połowa ludzkiej populacji jest zagrożona zarażeniem a przedstawione w nim statystyki wskazują, że w roku 2006 z 247 mln zakażeń prawie 881 tys. zakończyło się śmiercią zarażonej osoby, [115]. Malaria jest chorobą powodowaną przez pasożyta *Plasmodium*. U ludzi jego poszczególne stadia rozwijają się w wątrobie i czerwonych komórkach krwi - erytrocytach. Stadium rozwojowe pasożyta w erytrocycie jest odpowiedzialne za hydrolizę hemoglobiny do wolnego hemu oraz łańcuchów aminokwasów, powodując tym samym objawy chorobowe. Ponieważ uwolniony hem jest bardzo toksyczny dla komórki pasożyta wytworzył on mechanizmy obronne, które prowadzą do odkładania toksycznego hemu w mikrokryształiczny materiał - hemozoinę. Proces tworzenia hemozoiny na poziomie molekularnym pozostaje niewyjaśniony do tej pory, [11, 77, 116]. Również na poziomie molekularnym nieznane jest działanie antymalarycznych leków powodujących zatrzymanie lub znaczne spowolnienie syntezy mikrokryształicznego materiału. Ze względu na drogi proces ekstrakcji hemozoiny jak również jej właściwości fizykochemiczne (bardzo słaba rozpuszczalność) wytworzono do badań laboratoryjnych jej substytut meso-hematynę. Przedmiotem części rozprawy było potwierdzenie podobieństwa struktury wytworzonego, rozpuszczalnego związku meso-hematyny do innego substytutu hemozoiny - nierozpuszczalnej β -hematyny, którego strukturę uznano za taką, jak struktura naturalnego produktu pasożyta, [37]. Następnie zbadano wpływ jednego z najdłuższych stosowanych antymalarycznych leków - chlorochininy na strukturę meso-hematyny w roztworze. W tym celu zastosowano metodę rentgenowskiej spektroskopii absorpcyjnej na krawędzi K atomu żelaza, która pozwoliła na określenie lokalnego atomowego otoczenia tego pierwiastka.

Wyniki analizy zarówno EXAFS jak i XANES wskazują na podobieństwo struktury atomowej lokalnego otoczenia atomu żelaza w mikrokryształach meso-hematyny i β -hematyny, co potwierdza dimerowy charakter cząsteczek związku meso-hematyny. Jednocześnie struktura lokalna absorbera w obydwu substytutowych związkach różni się od struktury wyznaczonej dla hematyny (o niedimerowym charakterze cząsteczek), w szczególności co do liczby koordynacyjnej

tlenowego ligandu żelaza. Stąd wniosek, że wiązanie żelazo-tlen jest bardziej stabilne, jeśli jest związane w strukturę mostka tlenowego, tak jak ma to miejsce w dimerowych cząsteczkach substytutu hemozoiny.

Przeprowadzono eksperymenty rentgenowską metodą absorpcyjną, oraz analizę uzyskanych z niej danych dla roztworów meso-hematyny w dwu organicznych rozpuszczalnikach: kwasie octowym i dimetylosulfotlenku, przed i po dodaniu antymalarycznego leku - chlorochininy. W przypadku kwasu octowego przeprowadzono również eksperymenty w obecności wody dla dwóch różnych jej stężeń. Otrzymane rezultaty podsumowano następująco:

- struktura lokalnego otoczenia żelaza ulega zmianom w zależności od rodzaju organicznego roztworu. Zmiany wskazują na rozerwanie struktury dimeru w kwasie octowym i zachowanie jej w dimetylosulfotlenku.
- nie zaobserwowano znaczącego wpływu chlorochininy na lokalne otoczenie atomu żelaza dla roztworu meso-hematyny w czystym kwasie octowym.
- wpływ chlorochininy na atomowe otoczenie absorbującego atomu żelaza meso-hematyny w roztworach kwasu octowego jest obserwowany po dodaniu wody. Zwiększa się liczba cząsteczek złożonych z pojedynczego pierścienia FePPIX bez ligandu atomu żelaza. Potwierdza to przypuszczalny mechanizm doprowadzenia do zniszczenia komórki pasożyta malarii poprzez tworzenie toksycznego kompleksu chlorochininy z cząsteczką FePPIX o niedimerowym charakterze, co w konsekwencji doprowadza do wytworzenia wolnych rodników tlenowych, [117].
- nie zaobserwowano wiązania cząsteczki chlorochininy do cząsteczki pojedynczego pierścienia FePPIX w promieniu do $3.5\text{\AA}$ od pierścieniowego atomu żelaza w roztworach kwasu octowego z dodatkiem wody.
- cząsteczka chlorochininy wiąże się prawdopodobnie z dimerową cząsteczką meso-hematyny poprzez wiązanie typu $\pi - \pi$ w roztworze dimetylosulfotlenku. Taki wniosek może potwierdzać rozważaną w literaturze hipotezę, [13], że kompleks cząsteczki chlorochininy z dimerową cząsteczką FePPIX zapobiega wbudowaniu tej ostatniej w strukturę mikrokrystalitu.
- dimerowa cząsteczka FePPIX nie występuje w formie μ -oxo dimeru ani w roztworze kwasu octowego, ani w roztworze dimetylosulfotlenku zarówno w obecności chlorochininy jak i bez.
- brak obecności atomu chloru w otoczeniu atomu żelaza w strefie o promieniu $4\text{\AA}$ w obydwu rozpuszczalnikach z dodatkiem chlorochininy, pomimo doniesień o istotnej roli tego atomu w wiązaniu FePPIX z cząsteczką antymalarycznego leku, [92, 118].

W niniejszej rozprawie przedstawiono również wyniki analizy badań spektroskopową metodą absorpcji rentgenowskiej dla lokalnego otoczenia atomu żelaza w strukturze półproduktu potencjalnego fotouczulacza. Fotouczulacze to substancje chemiczne wykorzystywane w fotodynamicznej diagnostyce (PDD) i terapii (PDT) nowotworów. Wykazują tendencje do kumulowania się w tkankach nowotworowych, gdzie po wzbudzeniu ich wiązką laserową o odpowiedniej długości fali dochodzi do zjawiska fluorescencji (wykorzystywanego w diagnostyce), oraz zapo-

czątkowania serii reakcji chemicznych prowadzących do powstania wolnych rodników tlenowych, w tym bardzo toksycznego tlenu singletowego, powodujących rozpad komórek tkanki nowotworowej (zjawisko indukowane w fotodynamicznej terapii). Idealny fotouczulacz powinien być nietoksyczny dla organizmu. Z uwagi na obecność metali pierwiastków ciężkich w badanym związku ten warunek nie jest spełniony. Do zastosowania optymalnej metody oczyszczania produkowanego do celów leczniczych związku z metali ciężkich niezbędne było znalezienie w jego cząsteczce miejsca wiązania atomów żelaza i zidentyfikowanego w trakcie prowadzonych badań absorpcyjnych bromu w jego budowie .

Stwierdzono, że najbardziej prawdopodobnym miejscem wiązania atomu żelaza w produkowanym fotouczulaczu jest centrum pierścienia protoporfiryny PPIX. Atom bromu został wykryty w pozycji ligandu żelaza.

Wszystkie zamieszczone powyżej wnioski są poparte wynikami analizy rentgenowskich widm absorpcyjnych, które zamieszczono i przedyskutowano w Rozdziale 5 niniejszej rozprawy. Wprowadzenie do teoretycznych podstaw zastosowanej techniki pomiarowej zawarto w Rozdziale 3. Opis próbek i sposobu przeprowadzenia eksperymentu przedstawiono w Rozdziale 2. Wprowadzenie do zagadnień związanych z syntetycznym odpowiednikiem hemozoiny, oraz potencjalnym fotouczulaczem zamieszczono w Rozdziale 1.

Bibliografia

- [1] A. Yayon, E.R. Bauminger, S. Ofer, and H. Ginsburg. *J. Biol. Chem.*, 259:8163–8167, 1984.
- [2] I.W. Sherman. *Malaria : Parasite Biology, Pathogenesis and Protection*. ASM Press, Washington, DC., 1998.
- [3] P.A. Berman P.A. Adams. *Free Radical Bio. Med.*, 22:1283–1288, 1997.
- [4] S. Kumar and U. Bandyopadhyay. *Toxicology Letters*, 157 (3):175–188, 2005.
- [5] S.H. Vincent. *Seminars in Hematology*, 26 (2):105–113, 1989.
- [6] T.H. Schmitt, Jr.W.A. Frezzatti, and S. Schreier. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 307 (1):96–103, 1993.
- [7] A.F. Slater and A. Cerami. *Nature*, 355 (6356):167–169, 1992.
- [8] J. Ziegler, R. Linck, and D.W. Wright. *Current Medicinal Chemistry*, 8 (2):171–189, 2001.
- [9] N. Campanale, C. Nickel, C.A. Daubenberger, D.A. Wehlan, J.J. Gorman, N. Klonis, K. Becker, and L. Tilley. *The Journal of Biological Chemistry*, 278 (30):27354–27361, 2003.
- [10] C.W. Wright, J. Addae-Kyereme, A.G. Breen, J.E. Brown, M.F. Cox, S.L. Croft, Y. Gokcek, H. Kendrick, R.M. Phillips, and P.L. Pollet. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44 (19):3187–3194, 2001.
- [11] T.J. Egan. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 1 (1):113–123, 2001.
- [12] D.G. Spiller, P.G. Bray, R.H. Hughes, S.A. Ward, and M.R. White. *Trends in Parasitology*, 18 (10):441–444, 2002.
- [13] R. Buller, M.L. Peterson, Ö. Almarsson, and L. Leiserowit. *Crystal Growth and Design*, 2(6):553–562, 2002.
- [14] I. Solomonov, M. Osipova, Y. Feldman, C. Baehtz, K. Kjaer, I.K. Robinson, G.T. Webster, D. McNaughton, B.R. Wood, I. Weissbuch, and L. Leiserowitz. *J. Am. Chem. Soc.*, 129:2615–2627, 2007.
- [15] T.J. Egan and K.K. Ncokazi. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99 (7):1532–1539, 2005.

- [16] C.D. Fitch and A.C. Chou. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 82:261–264, 1996.
- [17] T.J. Egan. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100:916–926, 2006.
- [18] S. Moreau, B. Perly, C. Chachaty, and C. Deleuze. *Biochim. Biophys. Acta*, 840:107–116, 1985.
- [19] I. Constantinidis and J.D. Satterlee. *J. Am. Chem. Soc.*, 110:4391–4395, 1988.
- [20] A.C. de Dios, R. Tycko, L.M.B. Ursos, and P.D. Roepe. *J. Phys. Chem. A*, 107:5821–5825, 2003.
- [21] T.J. Egan, W.W. Mavuso, D.C. Ross, and H.M. Marques. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 68 (2):137–145, 1997.
- [22] A. Leed, K. DuBay, L.M. Ursos, D. Sears, A.C. De Dios, and P.D. Roepe. *Biochemistry*, 41 (32):10245–10255, 2002.
- [23] K.A. de Villiers, C.H. Kaschula, T.J. Egan, and H.M. Marques. *J. Biol. Inorg. Chemm*, 12:101–117, 2007.
- [24] T.J. Egan, J.Y.-J. Chen, K.A. de Villiers, T.E. Mabotha, K.J. Naidoo, K.K. Ncokezi, S.J. Langford, D. McNaughton, S. Pandiancherri, and B.R. Wood. *FEBS Lett.*, 580:5105–5110, 2006.
- [25] P.A. Winstanley, S.A. Ward, and R.W. Snow. *Microbes Infect*, 4:157–164, 2002.
- [26] J. Sachs and P. Malaney. *Nature*, 415 (6872):680–685, 2002.
- [27] A. Graczyk. *Fotodynamiczna metoda rozpoznawania i leczenia nowotworów*. Dom Wydawniczy Bellona, Warszawa, 1999.
- [28] H. Podbielska, A. Sieroń, and W. Stręk, editors. *Diagnostyka i terapia fotodynamiczna*. Wydawnictwo Medyczne Urban and Partner, Wrocław, 2004.
- [29] J. Miller. *Journal of Chemical Education*, 76:592–594, 1999.
- [30] J.M. Fernandez, M.D. Bilgin, and L.I. Grossweiner. *J. Photochem. Photobiol. B*, 37:131–141, 1997.
- [31] G.M. Luncisi. *De Noxiis Paludum Effluviis Eorumque Remediis*. Rome: J.M. Salvioni; 1717, 1717.
- [32] W.H. Brown. *J. Exp. Med.*, 13:290–299, 1911.
- [33] C.D. Fitch and P. Kanjanangkulpan. *J. Biol. Chem.*, 262:15552–15555, 1987.
- [34] A. Hamsik. *Z. Physiol. Chem.*, 1936.
- [35] A.F.G. Slater, W.J. Swiggard, B.R. Orton, W.D. Flitter, D.E. Goldberg, A. Cerami, and G.B. Henderson. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:325–329, 1991.

- [36] D.S. Bohle, R.E. Dinnebier, S.K. Madsen, and P.W. Stephens. *J Biol Chem*, 272:713–716, 1997.
- [37] S. Pagola, P.W. Stephens, D.S. Bohle, A.D. Kosar, and S.K. Madsen. *Nature*, 404:307–310, 2000.
- [38] M.Schaffer, P.M. Schaffer, L. Corti, M. Gardiman, G. Sotti, A. Hofstetter, G. Jori, and E.J. Duhmke. *Photochem. Photobiol. B*, 66:157–164, 2002.
- [39] D. Philips. *Prog. Reaction Kinetics*, 22:175–300, 1997.
- [40] D. Wöhrle A. Hirth, T. Bogdahn-Rai, G. Schnurpfeil, and M. Shopova. *Russ. Chem. Bull.*, 47:807–816, 1998.
- [41] M. Makarska. *Charakterystyka związków kompleksowych kationowych porfiryń rozpuszczalnych w wodzie*. PhD thesis, Wydział Chemii, UMCS Lublin, 2001.
- [42] M. Momenteau, D. Oulmi, and P. Maillard. *Photodynamic Therapy of Cancer II*, 2325:13–23, 1994.
- [43] L.A. Tomachynski, V.Y. Chernii, and S.V. Volkov. *J. Porphyr. Phthalocya.*, 5:731–739, 2001.
- [44] G.I. Stables and D.V. Ash. *Cancer Treat. Rev.*, 21:311–323, 1995.
- [45] B.K. Teo. *EXAFS spectroscopy Techniques and Applications*. Plenum Press, Washington, New York and London, 1981.
- [46] E.E. Doomes. *X-ray spectroscopy of geometrically constrained systems*. PhD thesis, Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, 2002.
- [47] A. Strzałkowski. *Wstęp do fizyki jądra atomowego*. PWN, 1978.
- [48] http://www.ortec-online.com/detectors/review_physics/intro.htm.
- [49] http://hasylab.desy.de/facilities/doris_iii/beamlines/a1/old_a1_setup/.
- [50] <http://www.esrf.eu/usersandscience/experiments/crg/bm26/xafs/>.
- [51] <http://www.esrf.eu/usersandscience/experiments/hrrs/id26/>.
- [52] D.S. Bohle, A.D. Kosar, and P.W. Stephens. *Acta Cryst.*, 58:1752–1756, 2002.
- [53] G. Blauer and M. Akkawi. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 66:145–152, 1997.
- [54] www.desy.de/~klmn/xafsmass.html.
- [55] V.L. Aksenov, A.Yu. Kuzmin, J. Purans, and S.I. Tyutyunnikov. *Physics of Particles and Nuclei*, 32 (6):1–33, 2001.

- [56] P.A. Lee and J.B. Pendry. *Phys.Rev.B.*, 11:2795–2811, 1975.
- [57] J.J. Rehr, J. Mustre de Leon, S.I. Zabinsky, and R.C. Albers. *J. Am. Chem. Soc.*, 113(14):5135–5140, 1991.
- [58] M.G. Newville. *Local Thermodynamic Measurements of Dilute Binary Alloys Using XAFS*. PhD thesis, University of Washington, 1995.
- [59] B. Ravel. *Journal of Alloys and Compounds*, 401:118–126, 2005.
- [60] J.J. Sakurai. *Modern Quantum Mechanics*. Addison-Wesley, 1985.
- [61] N.W. Ashcroft and N.D. Mermin. *Fizyka ciała stałego*. PWN, 1986.
- [62] J.J. Rehr and R.C. Albers. *Phys Rev B*, 41:8139–8149, 1990.
- [63] S.J. Gurman, N. Binsted, and I. Ross. *J.Phys.C.*, 17:143–151, 1984.
- [64] S.J. Gurman, N. Binsted, and I. Ross. *J.Phys.C.*, 19:1845–1861, 1986.
- [65] S.J. Gurman. *J.Phys.C.*, 21:3699–3717, 1988.
- [66] F.W. Lytle, D.E. Sayers, and E.A. Stern. *Physica B.: Physics of Condensed Matter*, 158:701–722, 1989.
- [67] A.L. Ankudinov, B. Ravel, J.J. Rehr, and S.D. Conradson. *Phys. Rev. B*, 58:7565–7576, 1998.
- [68] A.L. Ankudinov and J.J. Rehr. *Phys. Rev. B*, 62:2437–2445, 2000.
- [69] J.Mustre de Leon, J.J Rehr, and S.I. Zabinsky. *Phys.Rev.B*, 41 (12):8139–8149, 1990.
- [70] M. Benfatto, S. Della Longa, and C.R. Natoli. *J. Synchrotron Rad.*, 10:51–57, 2003.
- [71] C.R. Natoli and M. Benfatto. *J. Phys. (France) Colloq.*, 47(C8):11–23, 1986.
- [72] P. Durham, J.B. Pandry, and C.H. Hodges. *Comput. Phys. Commun.*, 25:193–200, 1982.
- [73] T.A. Tyson, K.O. Hodgson, C.R. Natoli, and M. Benfatto. *Phys. Rev. B*, 46:5997–6019, 1992.
- [74] J.G. Norman. *Mol. Phys.*, 31:1191–1198, 1976.
- [75] L. Hedin and S. Lundqvist. *Solid State Phys.*, 23:1–15, 1969.
- [76] M. Walczak, K. Lawniczak-Jablonska, A. Sienkiewicz, I.N. Demchenko, E. Piskorska, G. Chatain, and D.S. Bohle. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 238:32–38, 2005.
- [77] T.J. Egan. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 102:1288–1299, 2008.

- [78] M.F. Oliveira, S. Kycia, A. Gonzales, A.D. Kosar, D.S. Bohle, E. Hempelmann, D. Menezes, M. Vannier-Santos, P.L. Oliveira, and S.T. Ferreira. *FEBS Letters*, 579:6010–6016, 2005.
- [79] D.S. Bohle, A.D. Kosar, and P.W. Stephens. *Can. J. Chem.*, 81:1285–1291, 2003.
- [80] A. Boffi, T.K. Das, S. della Longa, C. Spagnuolo, and D. L. Rousseau. *Biophysical Journal*, 77:1143–1149, 1999.
- [81] M.G. Cheng, A.M. Rich, R.S. Armstrong, P.J. Ellis, and P.A. Lay. *Inorg. Chem.*, 38:5703–5708, 1999.
- [82] T.E. Westre, P. Kennepohl, J.G. DeWitt, B. Hedman, K.O. Hodgson, and E.I. Solomon. *J. Am. Chem. Soc.*, 119:6297–6314, 1997.
- [83] A. Labhardt and C. Yuen. *Nature*, 277:150–151, 1979.
- [84] A. Bianconi, A. Congiu-Castellano, M. Dell’Ariccia, P.J. Durham, E. Burattini, and M. Barteri. *FEBS Letters*, 178:165–170, 1984.
- [85] A. Bianconi, A. Congiu-Castellano, P.J. Durham, S.S. Hasnain, and S. Phillips. *Nature*, 318:685–687, 1985.
- [86] S. Della Longa, M. Girasole, A. Congiu Castellano, A. Bianconi, A. P. Kovtun, and A. V. Soldatov. *Eur. Biophys. J.*, 27:541–548, 1998.
- [87] C. Brouder. *J. Phys.: Condens. Matter*, 2:701–738, 1990.
- [88] J. Kawai. *Absorption techniques in X-ray spectroscopy. Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Wiley: Chichester, 2000.
- [89] F.A. Cotton. *Chemical Applications of Group Theory (2nd edn)*. John Wiley and Sons: New York, 1970.
- [90] S. Della Longa, G. Amiconi, O.A. Salah, I. Ascone, M. Barteri, A. Bertollini, A. Bianconi, and A. Congiu Castellano. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1294:72–76, 1996.
- [91] S.N. Cohen, K.O. Phifer, and K.L. Yielding. *Nature*, 202:805–806, 1964.
- [92] C.H. Kaschula, T.J. Egan, R. Hunter, N. Basilico, S. Parapini, D. Taramelli, E. Pasini, and D. Monti. *J. Med. Chem.*, 45:3531–3539, 2002.
- [93] S. Moreau, B. Perly, and J. Biguet. *Biochimie*, 64:1015–1025, 1982.
- [94] G.T. Webster, L. Tilley, S. Deed, D. McNaughton, and B. R. Wood. *FEBS Letters*, 582:1087–1092, 2008.
- [95] C.A. Hunter and J.K.M. Sanders. *J. Am. Chem. Soc.*, 112:5525–5534, 1990.
- [96] A.K. Bhattacharjee. *J. Mol. Struct.: THEOCHEM*, 549:27–37, 2001.

- [97] M.A. Rafiee, N.L. Hadipour, and H. Naderi-Manesh. *J. Comp. Aid. Mol. Des.*, 18:215–220, 2004.
- [98] C. Portela, C.M.M. Afons, M.M.M. Pinto, and M.J. Ramos. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 17:583–595.
- [99] G. Miessler. *Inorganic Chemistry (2nd ed.): acid base and donor-acceptor chemistry*. Prentice Hall, 1991.
- [100] R. Hayward, K.J. Saliba, and K. Kirk. *J. Cell. Sci.*, 119:1016–1025, 2006.
- [101] C.A. Homewood, D.C. Warhurst, W. Peters, and V.C. Baggaley. *Nature*, 235:50–52, 1972.
- [102] D.J. Krogstad and P.H. Schlesinger. *Biochemical Pharmacology*, 35:547–552, 1986.
- [103] T.J. Egan, R. Hunter, C.H. Kaschula H.M. Marques, A. Misplon, and J. Walden. *J. Med. Chem.*, 43:283–291, 2000.
- [104] K.A. de Villiers, H.M. Marques, and T.J. Egan. *Journal of Biochemistry*, 102:1660–1667, 2008.
- [105] M.J. Dascombe, M.G.B. Drew, H. Morris, P. Wilairat, S. Auparakkitanon, W.A. Moule, S. Alizadeh-Shekalgourabi, P.G. Evans, M. Lloyd, A.M. Dyas, P. Carr, and F.M.D. Ismai. *J. Med. Chem.*, 48:5423–5436, 2005.
- [106] T.J. Egan and K.K. Ncokazi. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 98:144–152, 2004.
- [107] A. Bianconi, A. Congiu-Castellano, M. Dell’Ariccia, A. Giovanneili, and S. Morante. *FEBS Letters*, 191:241–244, 1985.
- [108] S. Pin, V. Le Tilly, B. Alpert, and R. Cortes. *FEBS Letters*, 242:401–404, 1989.
- [109] H. Oyanagi, T. Iizuka, T. Matsushita, S. Saigo, R. Makino, and Y. Ishimura. *Journal de Physique Colloque C8 supplement au n0 12*, 47:1147–1150, 1986.
- [110] A. Sienkiewicz, J. Krzystek, B. Vilenko, G. Chatain, A.J. Kosar, D.S. Bohle, and L. Forro. *J. Am. Chem. Soc.*, 128:4534–4535, 2006.
- [111] T. Yamamoto. *X-Ray Spectrom.*, 37:572–584, 2008.
- [112] A. Dorn, S.R. Vippagunta, H. Matile, C. Jacquet, J.L. Vennerstrom, and R.G. Ridley. *Biochemical Pharmacology*, 55:727–736, 1998.
- [113] S.B. Brown and I.R. Lantzke. *Biochem. J.*, 115:279–285, 1969.
- [114] M.S. Walczak, K. Lawniczak-Jablonska, A. Sienkiewicz, M. Czuba, M. Klepka, and A. Graczyk. *J. Phys.: Condens. Matter*, 19:285214–285224, 2007.

- [115] <http://www.who.int/malaria/wmr2008/>.
- [116] T.J. Egan. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 157:127–136, 2008.
- [117] S. Kumar, M. Guha, V. Choubey, P. Maity, and U. Bandyopadhyay. *Life Sciences*, 80:813–828, 2007.
- [118] S.R. Vippagunta, A. Dorn, H. Matile, A.K. Bhattacharjee, J.M. Karle, W.Y. Ellis, R.G. Ridley, and R.G. Vennerstrom. *J. Med. Chem.*, 42:4630–4639, 1999.

Publikacje i prezentacje konferencyjne autora rozprawy

Publikacje

1. **The use and characterization of a back illuminated CCD in investigations of pulsed X-ray and radiation sources** W. Fullagar, J. Uhlig, M. Walczak, S. Canton and V. Sundström *Review of Scientific Instruments*, praca przesłana do recenzji (2008)
2. **The structure of Fe(III) ions in strongly alkaline aqueous solutions from EXAFS and Mössbauer spectroscopy** P. Sipos, D. Zeller, E. Kuzmann, A. Vértes, Z. Homonnay, M. Walczak and S. E. Canton *Dalton Transactions* 41, pp 5603 (2008)
3. **Atomic order in magnetic inclusion of Mn in Si crystal: XAS and TEM studies** A. Wolska, K. Lawniczak-Jablonska, S. Kret, P. Dłuzewski, A. Szczepanska, M. Klepka, M.S. Walczak, Y. Lefrais, M. J. Hÿtch, and A. Misiuk *Journal of Non-Crystalline Solids* 354, pp 4189 (2008)
4. **The local atomic structure of di-alanine amino acid derivative of protoporphyrin IX** M. S. Walczak, K. Lawniczak-Jablonska, A. Sienkiewicz, M. Czuba, M. Klepka and A. Graczyk *Journal of Physics: Condensed Matter* 19, pp 285214 (2007)
5. **Local structure around Mn atoms in Si crystals implanted with Mn+ studied using x-ray absorption spectroscopy techniques** A. Wolska, K. Lawniczak-Jablonska, M. Klepka, M. S. Walczak, A. Misiuk *Physical Review B* 751, pp 13201 (2007)
6. **A broadband laser plasma x-ray source for application in ultrafast chemical structure dynamics** W. Fullagar, M. Harbst, S. Canton, J. Uhlig, M. Walczak, C-G. Wahlström and V. Sundström *Review of Scientific Instruments* 78, pp 115105 (2007)
7. **Local environment of iron in malarial pigment and its substitute β -hematin** M. Walczak, K. Lawniczak-Jablonska, A. Sienkiewicz, I.N. Demchenko, E. Piskorska, G. Chatain and D.S. Bohle *Nuclear Instruments and Methods B* 238, pp 32 (2005)

Raporty synchrotronowe

8. **XANES investigation of local iron environment in synthetic homologues of malarial pigment** M. Walczak, K. Lawniczak-Jablonska, A. Wolska, M. Sikora *ESRF Report, Synchrotron ESRF* (2008)
9. **XANES and EXAFS studies of substitutes of malarial pigments** M. Walczak, K. Lawniczak-Jablonska *ESRF Report, Synchrotron ESRF* (2007)
10. **XAS investigation of Fe ions in chitosan complexes** K. Lawniczak-Jablonska, M. Klepka, M.S. Walczak, N. Nedelko, A. Slawska-Waniewska, C. A. Rodrigues, C. Bordini *Annual Report, Hamburger Synchrotronstrahlungslabor HASYLAB am Deutschen Elektronen- Synchrotron DESY* (2005)

11. **Local structure of Mn atoms in Mn-ion implanted Si** A. Wolska, K. Lawniczak-Jablonska, M. Klepka, M.S. Walczak, J. Bak-Misiuk and A. Misiuk Annual Report, Hamburger Synchrotronstrahlungslabor HASYLAB am Deutschen Elektronen- Synchrotron DESY (2005)
12. **Ge atom surrounding in Ge/Si heterostructures** I.N. Demchenko, K. Lawniczak-Jablonska, M. Chernyshova, M. Klepka, E. Piskorska, M. Walczak and E. Welter Annual Report, Hamburger Synchrotronstrahlungslabor HASYLAB am Deutschen Elektronen- Synchrotron DESY (2004)
13. **Ionic states of Fe and Ti in the raw materials used in pigments production** K. Lawniczak-Jablonska, M. Klepka, M. Walczak, I.N. Demchenko, E. Piskorska, M. Jabłoński Annual Report, Hamburger Synchrotronstrahlungslabor HASYLAB am Deutschen Elektronen- Synchrotron DESY (2004)
14. **EXAFS investigation of iron bond in malarial pigment and it's substitute β -hematin** K. Lawniczak-Jablonska, M. Walczak, A. Sienkiewicz, M. Chernyshova, I.N. Demchenko, E. Piskorska, G. Chatain and D. S. Bohle Annual Report, Hamburger Synchrotronstrahlungslabor HASYLAB am Deutschen Elektronen- Synchrotron DESY (2004)

Prezentacje konferencyjne

USTNE

15. **XANES and EXAFS studies of malarial pigment's substitutes in reaction with antimalarial drug** , M.S. Walczak, K. Lawniczak-Jablonska, A. Wolska, M. Sikora, A. Sienkiewicz, L. Suárez, A. Kosar, M.J. Bellemare, and D.S. Bohle, Synchrotron Radiation in Natural Science, Bulletin of the Polish Synchrotron Radiation Society, Vol. 7, Number 1-2, pp 97, Ameliówka, Polska, 15-20 czerwca, 2008
16. **EXAFS investigation of the local iron neighborhood in synthetic substitutes of malarial pigments** , M.S. Walczak, K. Lawniczak-Jablonska, A. Sienkiewicz, M. Czuba, M. Klepka, L. Suárez, A. Kosar, M.J. Bellemare, and D.S. Bohle, Synchrotron Radiation in Natural Science, Bulletin of the Polish Synchrotron Radiation Society, Vol. 5, Number 1-2, pp 44, Zakopane, Polska, 12-17 czerwca, 2006
17. **X-ray absorption for characterizing iron environment in malaria pigment and its synthetic substitute** , M. Walczak, K. Lawniczak-Jablonska, A. Sienkiewicz, I.N. Demchenko, E. Piskorska, G. Chatain and D.S. Bole, 6-th Polish Meeting of Synchrotron Radiation Users (KSUPS), Bulletin PSRS vol. 4, pp 52, Warszawa, Polska, 8-9 września, 2005

PLAKATY i inne

18. **Radiations from a Water Jet Plasma Source** W. Fullagar, J. Uhlig, M. Walczak, S. Canton, C-G. Wahlström, V. Sundström, VII. Research Course on New X-Ray Sciences, DESY Hamburg, Niemcy, 5-7 marca, 2008

19. **EXAFS investigation of the local atomic structure of di-alanino acid derivative of protoporphyrin IX** M.S. Walczak, K. Lawniczak-Jablonska, A. Sienkiewicz, M. Czuba, M. Klepka, A. Graczyk Book of Abstracts, E-MRS, pp 237, Warszawa, Polska, 17-21 września 2007
20. **Radiations from a Water Jet Plasma Source** W. Fullagar, J. Uhlig, M. Walczak, S. Canton, C-G. Wahlström, V. Sundström, New and emerging sources of intense beams of particles and short-wavelength radiation, Lund, Szwecja, 11-13 czerwca, 2007
21. **EXAFS technique in use to investigate local iron neighborhood inside compounds applicable in cancer therapy** M. Walczak, K. Lawniczak-Jablonska, M. Czuba, M. Klepka, A. Graczyk, S. Nikitenko, Book of Abstracts, European Conference on X-Ray Spectrometry, pp 193, Paryż, Francja, 19-23 czerwca, 2006
22. **XAS investigation of Fe ions in chitosan complexes** M. Klepka, K. Lawniczak-Jablonska, I. N. Demchenko, N. Nedelko, A. Slawska-Waniewska, M. Walczak, C.A. Rodrigues, C. Bordini, Book of Abstracts, European Conference on X-Ray Spectrometry, pp 191, Paryż, Francja, 19-23 czerwca, 2006
23. **Local structure of Mn atoms in Si implanted with Mn** A. Wolska, K. Lawniczak-Jablonska, S. Kret, M. Klepka, M.S. Walczak, and A. Misiuk, Synchrotron Radiation in Natural Science, Bulletin of the Polish Synchrotron Radiation Society, Vol. 5, Number 1- 2, pp 43, Zakopane, Polska, 12-17 czerwca, 2006
24. **X-ray absorption study of Fe ions in metal-chitosan complexes** M. Klepka, K. Lawniczak-Jablonska, I. N. Demchenko, N. Nedelko, A. Slawska-Waniewska, M. Walczak, C.A. Rodrigues, C. Bordini, Synchrotron Radiation in Natural Science, Bulletin of the Polish Synchrotron Radiation Society, Vol. 5, number 1- 2, pp 65, Zakopane, Polska, 12-17 czerwca, 2006
25. **EXAFS Technique - a tool to investigate the local atomic structure of di-amino acid derivatives of protoporphyrin IX** M.S.Walczak, K.Lawniczak-Jablonska, A.Sienkiewicz, M.Czuba, M.Klepka, A.Graczyk, Europhysics conference abstracts, Vol. 30C, pp 96, Będlewo, Polska, 11-13 maja, 2006
26. **Magnetic properties of malarial pigments** A. Sienkiewicz, J. Krzystek, M. Walczak, K. Lawniczak-Jablonska, B. Vilenko, G. Chatain, A.J. Kosar, D.S. Bohle, L.Forro, Book of Abstracts: MAG-EL-MAT Conference, Będlewo, Polska, 3-6 maja, 2006
27. **Xanes as a tool for estimation of Fe and Ti ionic state in raw materials used in pigments production** M. Klepka, K. Lawniczak - Jablonska, R. Minikayev, M. Jablonski, M. Walczak, A. Wolska, H. Rossner, 6-th Polish Meeting of Synchrotron Radiation Users (KSUPS), Bulletin PSRS vol. 4, pp 18, Warszawa, Polska, 8-9 września, 2005
28. **Local iron environment in diaminoacid derivatives of protoporphyrin IX** M.S. Walczak, BioXAS Practical Course on metalloproteins and organism tissue, Hamburg, Niemcy, 14-19 czerwca, 2005

29. **Monte Carlo simulation of X-ray emission spectra from multi components minerals** K. Lawniczak-Jablonska, M. Klepka, M. Walczak, I. N. Demchenko, M. Jabłoński, 9-th EMAS European Workshop on Modern Developments and Applications in Microbeam Analysis and 3-rd Meeting of the International Union of Microbeam Analysis Societies, Book of abstracts pp 302, Florencja, Włochy, 22-26 maja, 2005
30. **The single particle approach of EPMA for estimation a phase composition of altered ilmenite used in pigments production** M. Klepka, K. Lawniczak - Jablonska, R. Minikayev, M. Jabłoński, M. Walczak, A. Wolska, Z. Spolnik, R. Van Grieken, I.N. Demchenko, 9-th EMAS European Workshop on Modern Developments and Applications in Microbeam Analysis and 3-rd Meeting of the International Union of Microbeam Analysis Societies, Book of abstracts pp 296, Florencja, Włochy, 22-26 maja, 2005
31. **Analysis of stress in buried Ge layers by means of X-ray fluorescence** I.N. Demchenko, K. Lawniczak-Jablonska, K.S. Zhuravlev, M. Chernyshova, E. Piskorska, M. Walczak, M. Klepka, Applications of Linear and Area Detectors for X-ray and Neutron Diffraction and Spectroscopy, E-MRS 2004 Fall Meeting, Book of Abstracts pp 129, Warszawa, Polska, 6-10 września, 2004
32. **X-ray fluorescence detection of iron in diaminoacid derivatives of protoporphyrin IX** M. Walczak, K. Lawniczak-Jablonska, A. Sienkiewicz, I.N. Demchenko, M. Klepka, E. Piskorska, A. Graczyk, S. Moss, G. Chatain, D.S. Bohle, Applications of Linear and Area Detectors for X-ray and Neutron Diffraction and Spectroscopy, E-MRS 2004 Fall Meeting, Book of Abstracts pp 131, Warszawa, Polska, 6-10 września, 2004
33. **X-ray absorption, optical and electron microscopy complementary studies of Ge/Si nanostructures** I.N. Demchenko, K. Lawniczak-Jablonska, Z. Liliental-Weber, M. Chernyshova, E. Piskorska, M. Walczak, V. Glukhanuyk, D.N. Zakharov, M. Klepka, K.S. Zhuravlev, E. Welter, Synchrotron Radiation in Materials Science, SRMS- 4, Book of Abstracts pp 193, Grenoble, Francja, 23-25 sierpnia, 2004
34. **Local environment of iron in malarial pigments and diaminoacid derivatives of protoporphyrin IX** K. Lawniczak-Jablonska, M. Walczak, A. Sienkiewicz, M. Chernyshova, I.N. Demchenko, E. Piskorska, A. Graczyk, G. Chatain, D. S. Bohle, Synchrotron Radiation in Materials Science, SRMS- 4, Book of Abstracts pp 163, Grenoble, Francja, 23-25 sierpnia, 2004
35. **The composition of altered ilmenite used in pigments production as estimated by X-ray absorption and fluorescence analysis** K. Lawniczak-Jablonska, M. Jablonski, M. Klepka, M. Walczak, Z. Spolnik, R. Van Grieken, Synchrotron Radiation in Materials Science, SRMS- 4, Book of Abstracts pp 142, Grenoble, Francja, 23-25 sierpnia, 2004
36. **Studies of Ge/Si nanostructures: PL, EXAFS and TEM** I.N. Demchenko, K. Lawniczak-Jablonska, Z. Liliental-Weber, M. Chernyshova, E. Piskorska, M. Walczak, V. Glukhanuyk, D.N. Zakharov, M. Klepka, K.S. Zhuravlev, E. Welter, Synchrotron Radiation in Natural Science, Bulletin of the Polish Synchrotron Radiation Society, Vol. 3, number 1-2, pp 59, Zakopane, Polska, 8-13 czerwca, 2004

37. **EPMA and X-Ray Absorption Study of the Altered Ilmenite Used in Pigments Production** K. Lawniczak-Jablonska, M. Jablonski, M. Klepka, M. Walczak, Z. Spolnik, R. Van Grieken, Synchrotron Radiation in Natural Science, Bulletin of the Polish Synchrotron Radiation Society, Vol. 3, number 1-2, pp 107, Zakopane, Polska, 8-13 czerwca, 2004
38. **X-Ray Absorption for Characterizing Local Environment in Malaria Pigment** K. Lawniczak-Jablonska, M. Walczak, A. Sienkiewicz, M. Chernyshova, I.N. Demchenko, E. Piskorska, D. S. Bohle, Synchrotron Radiation in Natural Science, Bulletin of the Polish Synchrotron Radiation Society, Vol. 3, number 1- 2, pp 70, Zakopane, Polska, 8-13 czerwca, 2004
39. **X-Ray Absorption for Characterizing Local Environment in non-Crystalline Materials** K. Lawniczak-Jablonska, M. Walczak, A. Sienkiewicz, A. Graczyk, G. Chatain, D. S. Bohle, Europhysics Conference Abstracts, Vol. 28A, pp 86, Będlewo, Polska, 13-15 maja, 2004