

**UNIWERSYTET ZIELONOGÓRSKI
WYDZIAŁ FIZYKI I ASTRONOMII
INSTYTUT FIZYKI
ZAKŁAD SPEKTROSKOPII REZONANSÓW MAGNETYCZNYCH**

Lidia Kozdrowska

ROZPRAWA DOKTORSKA

**„WŁAŚCIWOŚCI CENTRÓW PARAMAGNETYCZNYCH
KOMPLEKSÓW DOPA-MELANINY
Z KANAMYCYNĄ I JONAMI MIEDZI(II)”**

*promotor: dr hab. n. fiz. Barbara Pilawa
profesor nadzwyczajny Śląskiej Akademii Medycznej*

Zielona Góra 2005

PODZIĘKOWANIA

Pani dr hab. Barbarze Pilawie, prof. nadzw. SAM, Kierownikowi Katedry i Zakładu Fizyki Medycznej Wydziału Farmaceutycznego Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach, składam serdeczne podziękowania za promotorski trud, wszechstronną pomoc, opiekę i życzliwość w trakcie powstawania rozprawy doktorskiej.

Panu prof. zw. dr hab. Tadeuszowi Wilczokowi, byłemu Rektorowi Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach, dziękuję za umożliwienie odbycia staży naukowych, które w nieoceniony sposób przyczyniły się do powstania niniejszej pracy.

Pani prof. dr hab. Ewie Buszman, Kierownikowi Katedry i Zakładu Chemii i Analizy Leków Wydziału Farmaceutycznego Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach oraz Pracownikom Katedry, dziękuję za możliwość wykonania i pomoc w przygotowaniu próbek melaninowych, dziękuję za wykonanie ich charakterystyki spektrofotometrycznej. Prof. dr hab. Ewie Buszman składam serdeczne podziękowania za wszechstronne i owocne dyskusje naukowe.

Pani mgr Longinie Świątkowskiej z Katedry i Zakładu Analizy Instrumentalnej Wydziału Farmaceutycznego Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach dziękuję za wyznaczenie parametrów stosowanych funkcji metodami estymacji nieliniowej z użyciem pakietu statystycznego STATISTICA.

Pani dr Ewie Choduręk z Katedry i Zakładu Biofarmacji Wydziału Farmaceutycznego Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach, serdecznie dziękuję za cenne dyskusje naukowe dotyczące struktury chemicznej melanin.

Panu prof. dr hab. Andrzejowi Więckowskiemu, byłemu Kierownikowi Zakładu Spektroskopii Rezonansów Magnetycznych Instytutu Fizyki Uniwersytetu Zielonogórskiego, składam serdeczne podziękowania za cenne dyskusje naukowe oraz sugestie dotyczące struktury chemicznej centrów paramagnetycznych.

Panu dr hab. Pawłowi Bolesławowi Sczanieckiemu, prof. UZ, Kierownikowi Zakładu Spektroskopii Rezonansów Magnetycznych Instytutu Fizyki Uniwersytetu Zielonogórskiego, i Pracownikom Zakładu dziękuję za życzliwą atmosferę, owocne dyskusje i nieocenioną pomoc podczas wykonywania pomiarów temperaturowych EPR.

Wszystkim Pracownikom Instytutu Fizyki oraz Pracownikom byłego Wydziału Nauk Ścisłych Uniwersytetu Zielonogórskiego składam serdeczne podziękowania za okazaną mi pomoc, życzliwość i wsparcie w trakcie powstawania niniejszej rozprawy.

SPIS TREŚCI

1. WPROWADZENIE	6
1.1. Polimery melaninowe	6
1.1.1. Występowanie i podział melanin	6
1.1.2. Funkcje biologiczne melanin	7
1.1.3. Biosynteza eumelanin	8
1.1.4. Własności fizykochemiczne melanin	10
1.1.5. Powinowactwo melanin do substancji leczniczych	11
1.1.6. Kompleksy melanin z jonami metali	12
1.2. Struktura melanin	16
1.2.1. Badania strukturalne melanin metodą spektrometrii masowej z chromatografią gazową z wykorzystaniem pirolizy Py-GC/MS	16
1.2.2. Modele strukturalne melanin	17
1.3. Badania melanin metodą elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR/ESR), podwójnego rezonansu elektronowo-jądrowego (ENDOR) oraz innymi metodami.....	23
1.4. Czynniki kompleksujące stosowane w pracy	26
1.4.1. Własności i zastosowanie kanamycyny	26
1.4.2. Rola miedzi w organizmach żywych	28
1.5. Stany trypletowe w układach rodnikowych	29
2. CEL PRACY.....	31
3. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA	33
3.1. Otrzymywanie i charakterystyka próbek	33
3.1.1. Synteza DOPA-melaniny.....	33

3.1.2.	Kompleksy (DOPA-melanina)-kanamycyna oraz (DOPA-melanina)-Cu(II)	35
3.1.3.	Kompleksy [(DOPA-melanina)-kanamycyna]-Cu(II) oraz [(DOPA-melanina)-Cu(II)]-kanamycyna]	36
3.1.4.	Badania ilościowe wiązania czynników kompleksujących do melaniny	37
3.1.5.	Zestawienie badanych próbek	38
3.1.6.	Ilość kanamycyny i jonów miedzi(II) związanych z melaniną	39
3.1.7.	Zastosowane odczynniki chemiczne	40
3.2.	Spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) jako metoda badawcza zastosowana w pracy	41
3.2.1.	Przebieg pomiarów EPR	41
3.2.2.	Wyznaczanie koncentracji centrów paramagnetycznych ...	43
3.2.3.	Analiza kształtu linii EPR	43
3.2.4.	Badania wpływu mocy mikrofalowej na widma EPR	44
3.2.5.	Badania wpływu temperatury pomiaru na intensywność i szerokość linii EPR	46
4.	WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA WYNIKÓW	53
4.1.	Widmo EPR DOPA-melaniny oraz parametry widm EPR badanych kompleksów	53
4.1.1.	Kształt linii EPR DOPA-melaniny	53
4.1.2.	Widma EPR kompleksów DOPA-melaniny z kanamycyną i jonami miedzi(II)	57
4.1.3.	Koncentracja wolnorodnikowych centrów paramagnetycznych w badanych próbkach oraz parametry ich widm EPR	61
4.2.	Widma EPR jonów miedzi(II) w badanych kompleksach	68
4.2.1.	Ogólna charakterystyka widm EPR jonów miedzi(II)	68
4.2.1.	Otoczenie koordynacyjne jonów miedzi(II) w melaninie	70
4.3.	Nasycenie mikrofalowe widm EPR badanych próbek	73

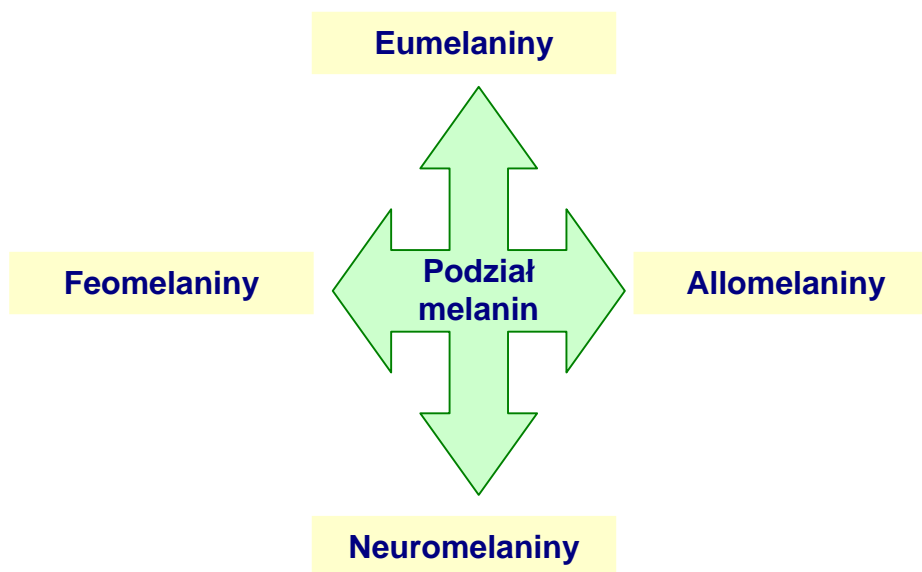
4.3.1.	Wpływ mocy mikrofalowej na wolnorodnikowy sygnał EPR melaniny	73
4.3.2.	Wpływ mocy mikrofalowej na widma EPR jonów miedzi(II) w badanych kompleksach DOPA-melaniny	85
4.4.	Termicznie wzbudzone stany trypletowe w kompleksach DOPA-melaniny z kanamycyną i jonami miedzi(II)	95
4.4.1.	Temperaturowa zależność intensywności i szerokości linii sygnału EPR DOPA-melaniny	95
4.4.2.	Struktura chemiczna melaninowych centrów paramagnetycznych o spinie $S = 1$ oraz $S = \frac{1}{2}$	111
4.5.	Wpływ temperatury pomiaru na widma EPR jonów miedzi(II) w badanych kompleksach DOPA-melaniny	115
5.	WNIOSKI	117
6.	LITERATURA	119
7.	STRESZCZENIE	131
8.	ABSTRACT	134

1. WPROWADZENIE

1.1. Polimery melaninowe

1.1.1. Występowanie i podział melanin

Melanina jest biopolimerem szeroko rozpowszechnionym w przyrodzie [1–12]. Występuje w organizmach zwierzęcych i roślinnych. U człowieka melanina znajduje się w skórze, uchu wewnętrznym, oku, włosach i mózgu. Melanina została wykryta również w ludzkiej krwi [13]. Fakt ten wskazuje na udział melaniny w procesach regulacji ogólnoustrojowej poprzez możliwość dotarcia do niemal wszystkich części organizmu. Podział melanin przedstawiono na rysunku 1.



Rys. 1. Podział melanin [1, 4, 14-15]

Eumelaniny występują w świecie zwierząt, nadają barwę brązowo-czarną skórze i włosom, zawierają węgiel, wodór, azot, tlen [15]. Proces biosyntezy eumelanin jest przedstawiony w rozdziale 1.1.3.

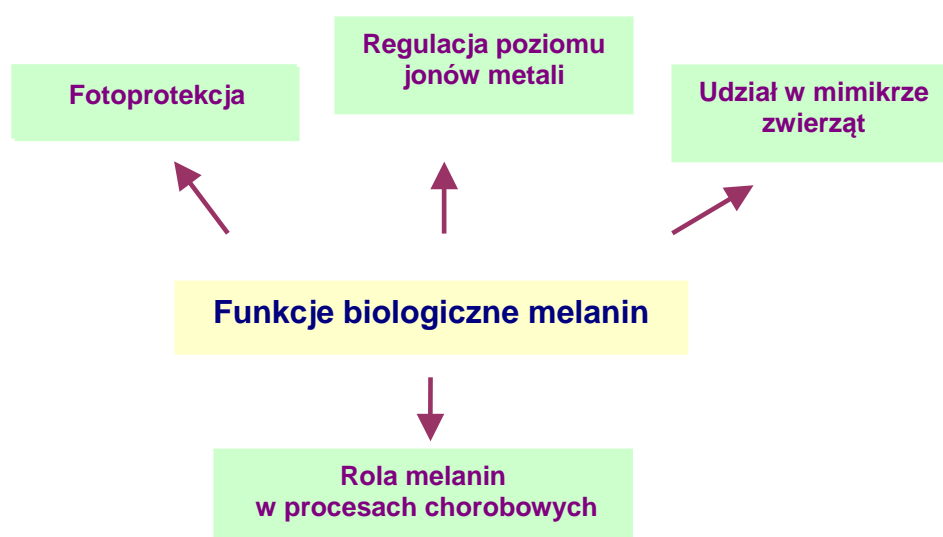
Feomelaniny powstają w wyniku modyfikacji syntezy eumelanin, zawierają 9-12% siarki, nadają rudą barwę włosom, sierści i piórom [15].

Allomelaniny występują w świecie roślin, grzybów i bakterii, nadają barwę czarną, powstają z prekursorów nie zawierających azotu [15].

Neuromelaniny powstają z amin katecholowych i z dopaminy. Występują w ośrodkowym układzie nerwowym (w pniu mózgu i w *substantia nigra*) [14].

1.1.2. Funkcje biologiczne melanin

Podstawowe funkcje biologiczne melanin przedstawiono na rysunku 2.



Rys. 2. Funkcje biologiczne melanin w organizmach zwierzęcych i roślinnych [15-19]

U osób o jasnej karnacji i rudych włosach, tzn. z przewagą feomelaniny występuje większe ryzyko powstania raka skóry [16-17, 20]. Feomelanina pod wpływem promieniowania UV ulega rozkładowi i dochodzi do powstawania czynników mutagennych. Fotoprotekcja polega na pochłanianiu i rozpraszaniu promieniowania UV [16-17, 20]. Pochłonięte promieniowanie przez melaninę prowadzi do powstawania wzbudzonych cząsteczek, które w reakcji z tlenem O_2 oddają elektron i tworzy się jon O_2^- oraz rodnik zlokalizowany na polimerze melaninowym. Produktem końcowym

reakcji jest nadtlenek wodoru, biorący udział w procesach oksydoredukcyjnych komórek. Melanina działa również jako akceptor elektronów, tworzy rodniki zapobiegając w ten sposób niekorzystnym skutkom procesów oksydoredukcyjnych zachodzącym w komórkach [20].

Regulacja poziomu jonów metali odgrywa ważną rolę w detoksykacji organizmu [17]. Melanina ma zdolność kumulowania jonów *in vivo*, które dzięki odpowiednim mechanizmom są wydalane z organizmu poprzez złuszczenie skóry i wypadanie włosów. Jednak przy nadmiernej kumulacji metali w polimerze, nasila się efekt toksyczny [17]. Melaniny odgrywają rolę w homeostazie, czyli w utrzymywaniu prawidłowego stężenia np. jonów metali w organizmie.

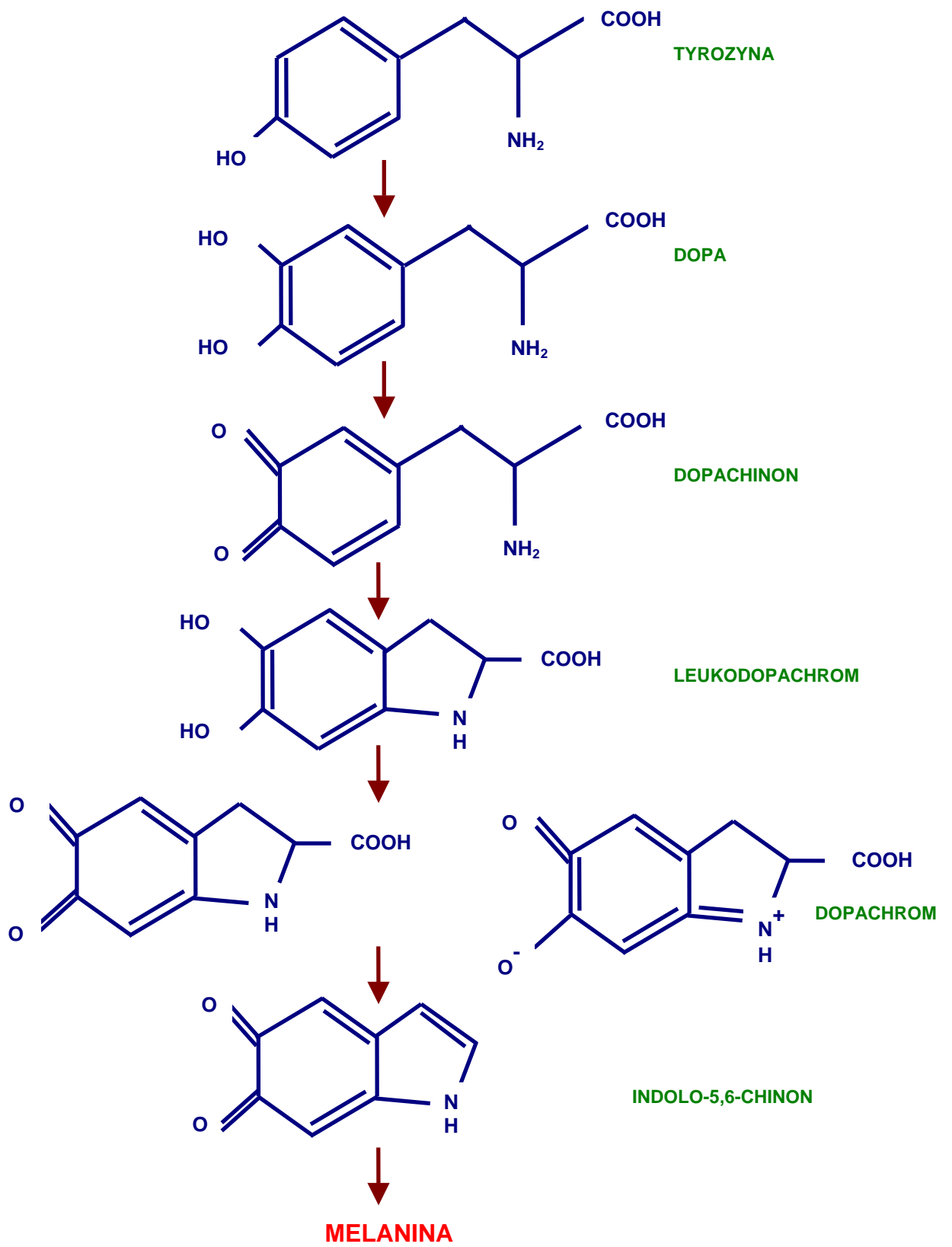
Melanina bierze udział w mimikrze zwierząt [18]. Mimikra jest to zdolność upodabniania się bezbronnych gatunków zwierząt do innych gatunków, posiadających przystosowania obronne, przez co zwierzę zyskuje dodatkową ochronę przed wrogami naturalnymi. Zjawisko mimikry jest częste w świecie owadów, znane jest również u węży i ryb.

Prowadzone są badania nad rolą melaniny w procesach chorobowych układu nerwowego [21-24] i AIDS [6-9]. Melanina pełni rolę ochronną przeciwko czynnikom zakaźnym (bakterie, wirusy, grzyby) [6-9].

1.1.3. Biosynteza eumelanin

Melanina powstaje w komórkach zwanych melanocytami [15]. Proces biosyntezy melanin stanowi szereg reakcji biochemicznych określane mianem melanogenezy.

Poniżej przedstawiono klasyczny schemat melanogenezy eumelanin, ponieważ syntetyczna melanina jaką użyto do badań w niniejszej pracy jest bardzo zbliżona właściwościami do naturalnych eumelanin. Synteza przebiega jako utlenianie tyrozyny do DOPA(3,4-dihydroksyfenyloalaniny) i dopachinonu w obecności enzymu tyrozinazy [15, 25] (rys.3). Kolejne etapy zachodzą spontanicznie prowadząc do powstania eumelaniny. Na rysunku 3 przedstawiono dwie możliwe formy występowania dopachromu. Jedną z nich jest tzw. jon obojnaczy, czyli jon, który posiada ładunek dodatni i ujemny.



Rys. 3. Schemat melanogenezy [15, 25]

1.1.4. Własności fizykochemiczne melanin

Badania własności i struktury melanin prowadzone są zarówno przy wykorzystaniu naturalnych melanin wyodrębnionych z organizmów żywych [3, 6-9, 11, 17, 26-29], jak i przy użyciu melanin syntetycznych [17, 23, 26, 30-35]. Syntetyczna melanina różni się od naturalnej mniejszą zawartością grup karboksylowych [15, 36]. Podwyższenie pH w procesie syntezy wpływa na wyższą zawartość grup karboksylowych i ugrupowań pirolowych. Różnice we właściwościach i strukturze melanin wynikają z rodzaju użytego prekursora i warunków panujących w środowisku syntezy (pH, światło, dodawane substancje) [20, 32, 37-39]. Polimery melaninowe typu mieszanego syntetyzowane są z określonych prekursorów w odpowiednich proporcjach [34]. Kopolimery melaninowe występują również naturalnie [36].

W celu wyjaśnienia funkcji biologicznych, jakie pełnią melaniny w organizmach, konieczne jest poznanie ich właściwości fizykochemicznych. Melaniny wykazują:

- nierozpuszczalność w wodzie oraz w rozpuszczalnikach organicznych i nieorganicznych [1, 15]
- amorficzność (brak uporządkowania dalekiego zasięgu) [15]
- brak pasm absorpcji w zakresie promieniowania widzialnego, UV i bliskiej podczerwieni [15]
- zdolność do odwracalnych reakcji utleniania i redukcji oraz będąca wynikiem tego zdolność do wymiany elektronowej [26]
- właściwości jonowymienne i powinowactwo do substancji leczniczych i jonów metali [2-3, 11, 14, 17, 32, 40-41]
- przewodnictwo i fotoprzewodnictwo elektryczne wiążące się z półprzewodnikową amorficzną strukturą polimeru [27]
- trwały paramagnetyzm [2-3, 11, 15, 17, 37-38]

1.1.5. Powinowactwo melanin do substancji leczniczych

Polimery melaninowe wykazują powinowactwo nie tylko do jonów metali, ale również do substancji leczniczych [17, 40-42, 45-47]. Uwzględniając znak ładunku substancji leczniczej i jonu metalu, te same miejsca wiążące w polimerze mogą wiązać zarówno lek jak i jony metalu. Wysokie powinowactwo stwierdzono w przypadku substancji leczniczych policyklicznych np. aminoglikozydów [17, 24, 30-31, 42-43]. Wiązanie leków z melanim zmienia jej właściwości w wyniku wprowadzenia czynnika kompleksującego, co jest istotne dla pełnionych przez nią funkcji biologicznych. Substancje lecznicze kumulują się w tkankach zawierających melanim (skóra, ucho wewnętrzne, oko, mózg) [1, 3, 15, 17, 23-24, 48-49]. Zbyt długi proces gromadzenia się substancji farmakologicznie czynnych wpływa niekorzystnie na organizm – ujawnia się toksyczne działanie leku. Dochodzi do powikłań, uszkodzenia słuchu, wzroku, nadpigmentacji skóry, zmian w układzie nerwowym.

Prowadzone badania zależności między strukturą leków i ich powinowactwem do melaniny, wykazały, że o powinowactwie leku do melaniny decyduje jego liczba centrów zdolnych do oddziaływań o charakterze jonowymiennym [24, 30, 42]. Elektrostatyczne przyciąganie występuje między dodatnio naładowanymi cząsteczkami leku a grupami karboksylowymi i orto-semichinonowymi melaniny, które w obojętnym pH przyjmują ładunek ujemny [17, 26, 28, 42]. Kompleksy melanima-lek mogą również powstawać na drodze reakcji przeniesienia ładunku (*charge-transfer*) lub z udziałem sił Van der Waalsa [46].

Powinowactwo leków do polimeru melaninowego zależy głównie od rodzaju i struktury melaniny, w mniejszym stopniu natomiast od warunków eksperymentu (pH środowiska inkubacyjnego) [40].

Wykazano, że jony metali związane z melanim wpływają na zdolność wiązania substancji leczniczych [17, 50-51]. W obecności jonów metalu obserwowano w melaminie mniejsze ilości przyłączonego leku do polimeru. Wyniki otrzymane metodą Scatcharda wykazały uczestnictwo dwóch klas miejsc wiążących w przypadku oddziaływania leku z DOPA-melanim i jednej klasy wiążącej w przypadku oddziaływań leku z kompleksem melanima-jon metalu [17]. Jony metali blokują część miejsc wiążących lek w strukturze

polimeru melaninowego. Za wiązanie substancji leczniczych i jonów metali z melaniną odpowiadają te same miejsca wiążące.

Wykazano, że substancje lecznicze wiążące się z melaniną na skutek oddziaływań elektrostatycznych nie wywołują ubocznych efektów toksycznych. Efekt toksyczny ma miejsce wtedy, gdy lek bierze udział w reakcjach wolnorodnikowych [26].

Podobnie jak kompleksy jonów metali z melaniną, również jej kompleksy z lekami charakteryzują się różną trwałością [17, 31, 41].

1.1.6. Kompleksy melanin z jonami metali

Melaniny wykazują powinowactwo do jonów metali w warunkach *in vivo* oraz *in vitro* [2, 17, 52-59]. Prowadzone są badania wiązania jonów metali z melaninami zarówno naturalnymi jak i syntetycznymi. Wiązanie jonów metali z polimerem melaninowym jest charakterystyczną własnością fizykochemiczną tego polimeru.

Do badań powinowactwa jonów metali do melaniny wykorzystywane są dwa rodzaje układów [60]:

- melanina + jony metalu
- prekursor melaniny + jony metalu.

Sposób przygotowywania kompleksu wpływa na różnice strukturalne otrzymywanych kompleksów, co odzwierciedla się w badaniach pirolitycznych melaniny i jej kompleksów z jonami metali [60]. Na skład jakościowy i ilościowy produktów termicznej degradacji chemicznej melanin syntetyzowanych w obecności jonów miedzi(II) wpływa nie tylko rodzaj użytego prekursora, ale również ilość jonów tego metalu obecnych w środowisku reakcji syntezy.

Badania wiązania jonów metali z melaniną mają na celu wyjaśnienie mechanizmu tego procesu oraz wskazanie miejsc wiążących w polimerze melaninowym. Na podstawie badań EPR zaadsorbowanych jonów dokonano analizy strukturalnej miejsc jonogennych melaniny [2]. Zadaniem wprowadzonych jonów w strukturę polimeru było testowanie otoczenia miejsc wiążących. Wykazano, że w melaninie występuje kilka rodzajów miejsc

jonogennych różniących się siłą kompleksowania. Są to ugrupowania karboksylowe, ugrupowania ortofenolowe oraz azotowe centra jonogenne.

Powinowactwo melanin do jonów metali ma zastosowanie w chemioterapii [61].

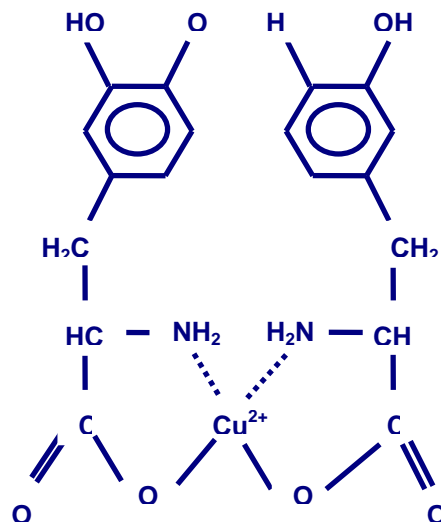
Powinowactwo jonów metali do melanin zależy od pH środowiska inkubacyjnego. Ze wzrostem pH obserwuje się aktywizację nowych miejsc wiążących w polimerze. Na efekt wiązania jonów metali do melaniny wpływa także wartościowość i masa atomowa jonów [62]. Ze wzrostem wartościowości wzrasta powinowactwo.

Ze wzrostem stężenia dodawanych jonów zaobserwowano wzrost ilości związanego metalu z polimerem melaninowym [17]. Przeprowadzono badania równoczesnego oddziaływania dwóch lub trzech rodzajów jonów metali z melaniną [17]. Zaobserwowano wiązanie się wszystkich jonów metali do melaniny, niezależnie od tego czy jony występują pojedynczo czy też tworzą mieszaninę jonów. Dwukrotne zwiększenie stężenia w mieszaninie dwóch rodzajów jonów (w odniesieniu do stężenia dla jednego rodzaju jonów), powoduje wzrost całkowitej ilości przyłączonych jonów nawet o 50% w porównaniu z kompleksem melanina-metal.

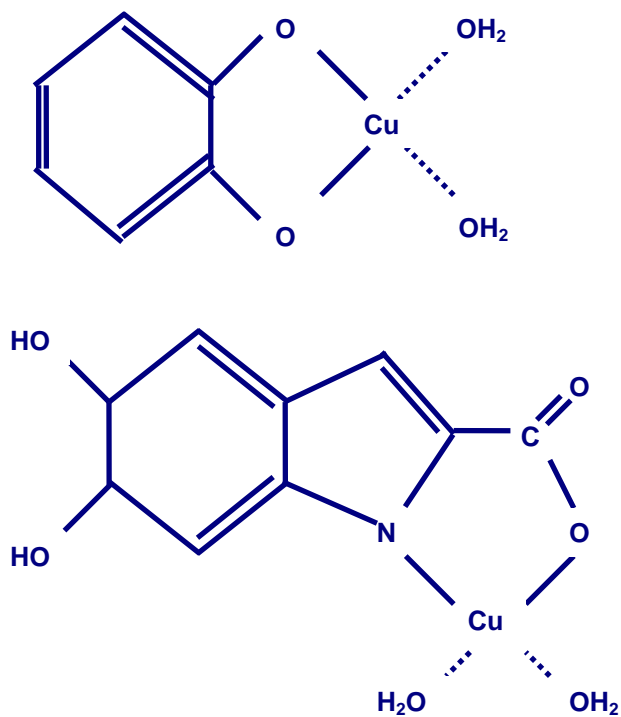
Zaobserwowano również zjawisko wypierania jonów metali związanych już z melaniną przez drugi rodzaj jonów metalu wprowadzony do otoczenia istniejącego już kompleksu [17]. Suma ilości jonów niewypartych z kompleksu melanina-metal oraz jonów nowozwiązanych jest przeważnie tego samego rzędu w porównaniu z ilością związanych jonów o silniejszym powinowactwie w pierwotnym układzie melanina-metal. Najsilniejsze zdolności wypierające jonów metali z kompleksów melaninowych mają trójwartościowe jony żelaza i chromu, a najsłabsze jony dwuwartościowe manganu i kadmu [17].

Wśród ugrupowań mogących pełnić rolę miejsc wiążących jony metali przez polimery melaninowe wymienia się grupy karboksylowe, orto-fenolowe, alifatyczne grupy aminowe oraz azot heteropierścieni aromatycznych [52].

Propozycję kompleksu DOPA – prekursora używanego do syntezy melaniny z jonami miedzi(II) przedstawia rysunek 4 [63], natomiast rysunek 5 przedstawia kompleksy melaniny z jonami miedzi(II) [53].

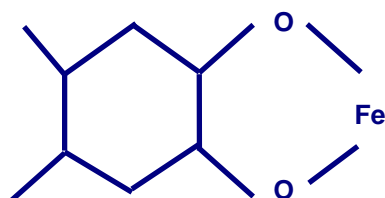


Rys. 4. Kompleks jonów miedzi(II) z DOPA [63]. Linią przerywaną zaznaczono wiązania koordynacyjne jakie tworzy jon miedzi(II) z NH_2



Rys. 5. Kompleksy melaniny z jonami miedzi(II) [53]. Linią przerywaną zaznaczono wiązania koordynacyjne jakie tworzy jon miedzi(II) z cząsteczkami wody

Wysokie powinowactwo do melaniny wykazują jony żelaza(III) [64]. Otoczenie koordynacyjne jonów żelaza stanowią grupy karboksylowe, fenolowe i aminowe. W zależności od użytego prekursora melaniny, zmianie ulega udział wymienionych grup w procesie wiązania. Przykładowy kompleks przedstawia rysunek 6.



Rys. 6. Kompleks melaniny z jonami żelaza(III) [64]

Neuromelaniny również wykazują powinowactwo do jonów żelaza [65].

W zależności od rodzaju melaniny (naturalna lub syntetyczna) obserwuje się różnice w powinowactwie do jonów metali. Syntetyczna DOPA-melanina wykazuje mniejsze powinowactwo do jonów metalu niż melanina naturalna wyizolowana z oczu wołu czy ludzkich włosów. Przyczyną tego zjawiska jest mniejsza zawartość grup karboksylowych w melaninie syntetycznej [15].

Przeprowadzone badania spektroskopowe w podczerwieni oraz metodą EPR sugerują, że w procesie wiązania jonów metali z melaniną udział biorą powierzchniowe grupy funkcyjne polimeru. Powinowactwo kationów metali przypisuje się oddziaływaniu elektrostatycznemu między nimi a grupami karboksylowymi melanin [13, 19].

Przekroczenie dopuszczalnej ilości jonów metalu w środowisku naturalnym (gleba) prowadzi do kumulowania się jonów metali w organizmach żywych [66]. Prowadzone są prace na temat pochłaniania jonów metali przez grzyby glebowe oraz wykorzystanie tego zjawiska w procesach detoksykacji środowiska naturalnego [59, 66-69].

Jeśli jony metali są toksyczne dla organizmu, melanina hamuje proces przedostawania się ich do komórek. W przypadku, gdy jony metali są niezbędne do fizjologii komórek, melanina gromadzi je w taki sposób, aby były bardziej dostępne [70].

Prowadzono również prace, które wykazały, że proces bielenia melanin pod wpływem działania H_2O_2 , O_2 oraz światła, przebiega szybciej w wyniku dodania do melaniny jonów miedzi [71].

1.2. Struktura melanin

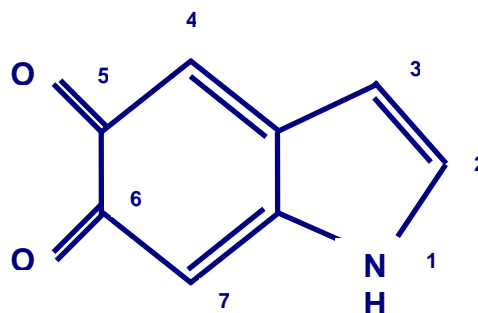
1.2.1. Badania strukturalne melanin metodą spektrometrii masowej z chromatografią gazową z wykorzystaniem pirolizy Py-GC/MS

Do badań strukturalnych melaniny ze względu na jej właściwości (szczególnie nierozpuszczalność), bardzo przydatną metodą jest spektrometria masowa z chromatografią gazową Py-GC/MS [39, 42, 71-76]. W tym rozdziale skupiono uwagę na charakterystycznych produktach pirolitycznego rozpadu syntetycznej DOPA-melaniny oraz jej kompleksów z jonami miedzi(II). Powodem takiego wyboru jest fakt, że próbki, które były analizowane w niniejszej pracy, zawierają ten właśnie rodzaj melaniny.

Wśród produktów termicznej degradacji DOPA-melaniny, największą abundancją charakteryzuje się pirol (30%), co wskazuje na znaczny udział jednostek typu indolowego i jednostek karboksypirolowych w budowie melaniny [72]. Jednostki 5,6-indolochinonowe ulegają termicznej degradacji w procesie pirolizy, co prowadzi do generowania piroli i metylopiroli. Do charakterystycznych produktów rozkładu pirolitycznego należy również benzen, toluen, styren, fenol oraz indol i ich pochodne [71-76].

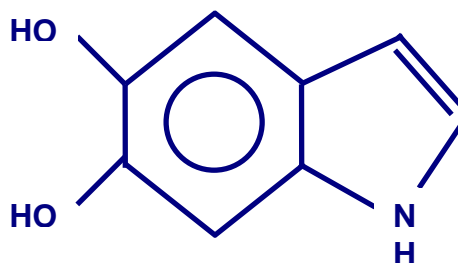
Jony miedzi(II) wywołują zmiany w strukturze polimeru melaninowego [39, 60]. W wyniku pirolizy kompleksu DOPA-melaniny z jonami miedzi(II), obok produktów charakterystycznych dla DOPA-melaniny syntetyzowanej w nieobecności jonów metalu, otrzymano nowe produkty. Należy do nich pirazyne oraz pirydyny i ich pochodne [60]. DOPA-melanina syntetyzowana w obecności jonów miedzi(II) charakteryzuje się ponadto mniejszą zawartością pochodnych benzenu, pirolu, fenolu i indolu w porównaniu z DOPA-melaniną syntetyzowaną w nieobecności jonów Cu(II) [60].

Przeprowadzone liczne badania nad strukturą melaniny dowodzą, że podstawową jednostką strukturalną tego polimeru jest indolo-5,6-chinon [77-79]. Wzór strukturalny indolo-5,6-chinonu przedstawia rysunek 7 [80].



Rys. 7. Wzór strukturalny indolo-5,6-chinonu [80]

W wyniku redukcji wodorem indolo-5,6-chinon przekształca się w 5,6-dihydroksiindol (rys. 8).

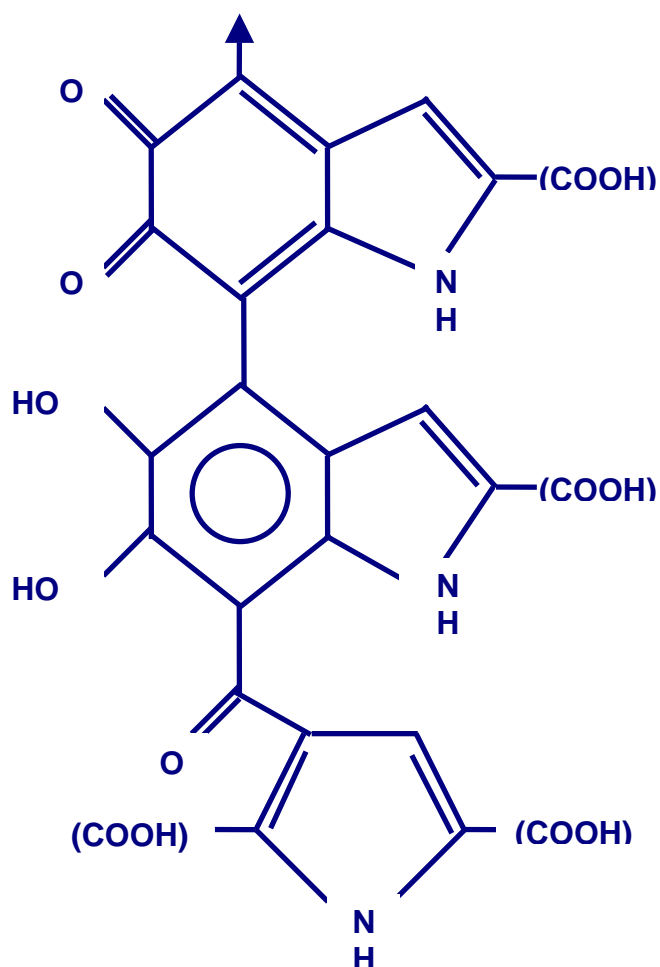


Rys. 8. Wzór strukturalny 5,6-dihydroksiindolu [80]

1.2.2. Modele strukturalne melanin

Na rysunku 9 przedstawiona jest jedna z proponowanych struktur melaniny [77]. Strzałka oznacza kierunek polimeryzacji. Oprócz indolo-5,6-chinonu i 5,6-dihydroksiindolu, widoczne są również inne jednostki strukturalne na przykład pirol [39, 60, 71-76]. Podanie w nawiasach grupy –

(COOH) wskazuje na możliwość jej występowania lub nie występowania w melaninie.

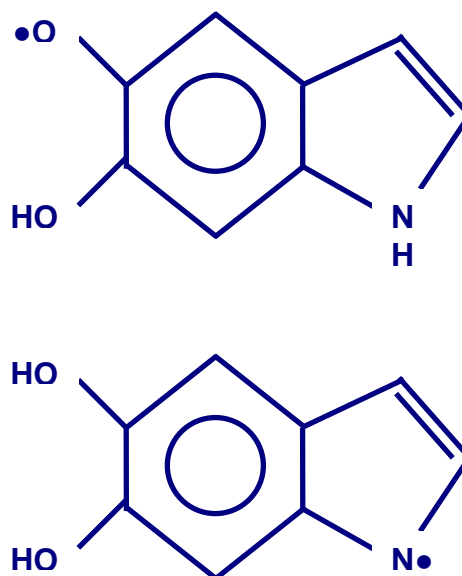


Rys. 9. Struktura melaniny wg Ito [77]

Wyniki uzyskane za pomocą metody Py-GC/MS [39, 60, 73] wykazują jednak znaczną obecność CO_2 , jako produktu rozkładu termicznego melaniny, co przemawia za opcją występowania grup COOH w polimerze melaninowym.

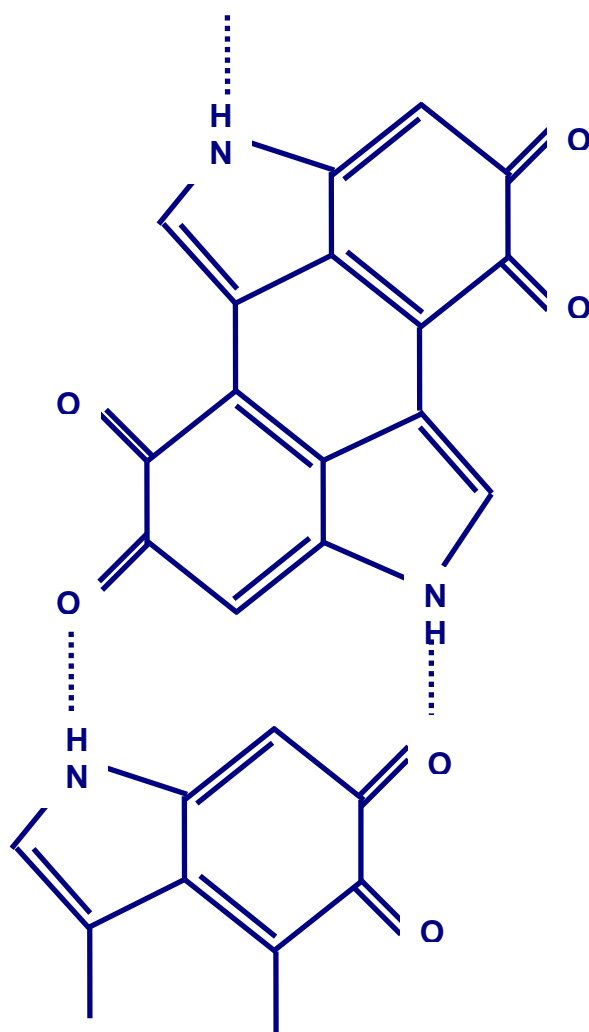
Proponowany przez Ito [77] fragment strukturalny melaniny (rys. 9) nie zawiera centrów paramagnetycznych. Centra paramagnetyczne powstają w wyniku reakcji powodujących zmiany w strukturze elektronowej podstawowych jednostek strukturalnych badanego polimeru. Powstałe zmiany są trwałe i nadają melaninie stabilny paramagnetyzm [2-3, 17, 37, 81-82]. Powszechnie uważa się, że za paramagnetyzm melanin odpowiadają wolne rodniki o niesparowanym elektronie zlokalizowanym na atomie tlenu

[2-3, 17, 50-51, 59]. W pracy [83] stwierdzono występowanie w modelowej neuromelaninie wolnych rodników o niesparowanym elektronie na atomie azotu. Mogą powstać jednostki 5,6-indolosemichinonu, w których niesparowany elektron jest zlokalizowany na atomie tlenu lub na atomie azotu. Rysunek 10 przedstawia propozycję dwóch rodnikowych tautomerów 5,6-indolosemichinonu ze spinem $S = \frac{1}{2}$ wynikającą z pracy [2-3, 17, 50-51, 59, 83]:



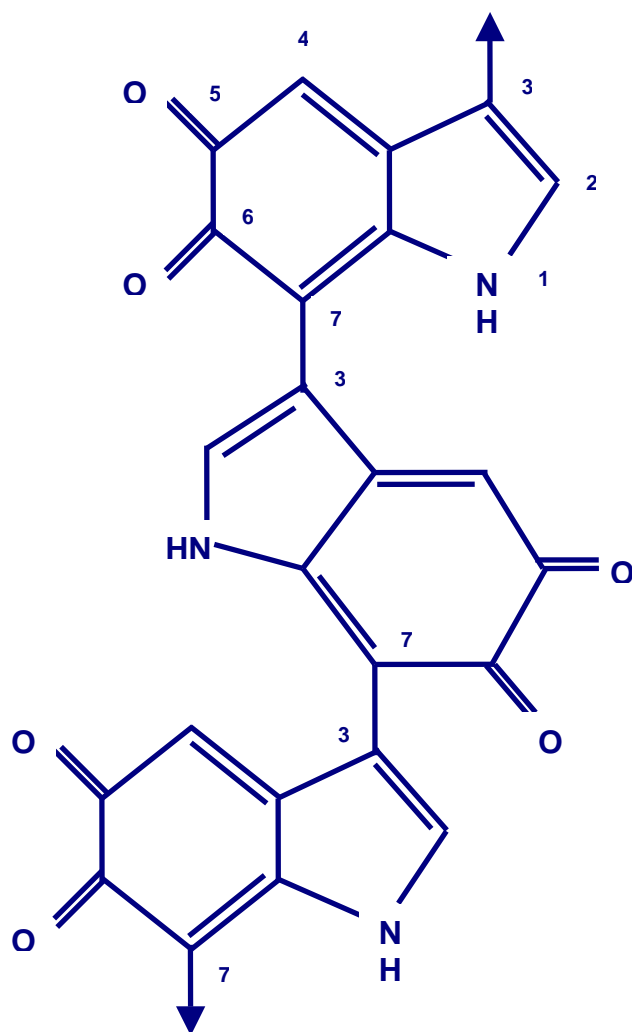
Rys.10. Tautomery 5,6-indolosemichinonu

Rysunek 11 przedstawia inną propozycję struktury melaniny [78]. Podstawową jednostką strukturalną jest również indolo-5,6-chinon. Na uwagę w tej propozycji zasługuje wskazanie na możliwość występowania wiązań wodorowych łączących jednostki indolochinonowe (rys. 11). Jednostki te mogą się łączyć również za pomocą wiązań tworzących pierścień.



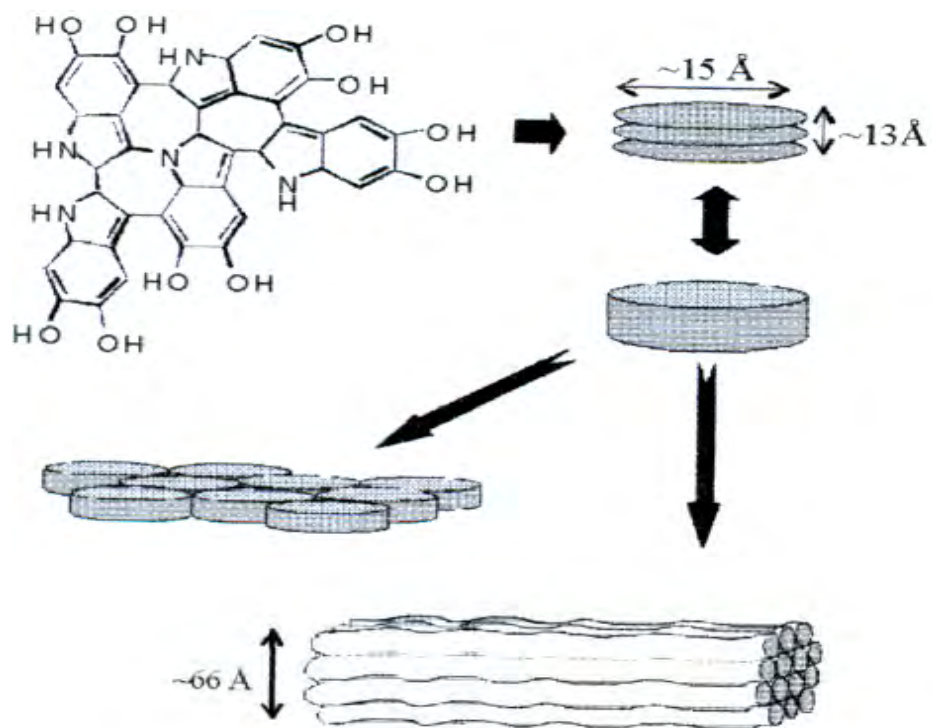
Rys.11. Struktura melaniny [78]

Kolejną interesującą propozycję struktury melaniny przedstawia rysunek 12 [79]. Podobnie jak na dwóch wyżej proponowanych strukturach, główną jednostkę budującą stanowi również indolo-5,6-chinon. W przypadku tego modelu melaniny, podobnie jak poprzednio, warto zwrócić uwagę na sposób łączenia jednostek polimeru. Miejsca wiążące zlokalizowane są na atomach węgla oznaczonych jako 3 i 7.



Rys. 12. Struktura melaniny [79]

Struktury, jakie tworzą polimery melaninowe są dobrze zdefiniowane w skali małego obszaru zajmowanego przez polimer. W przypadku polimeru melaninowego otrzymanego z DHI-melaniny, zaproponowany został model strukturalnego agregatu przedstawiający skupienie cząsteczek tworzących polimer (rys.13) [33].

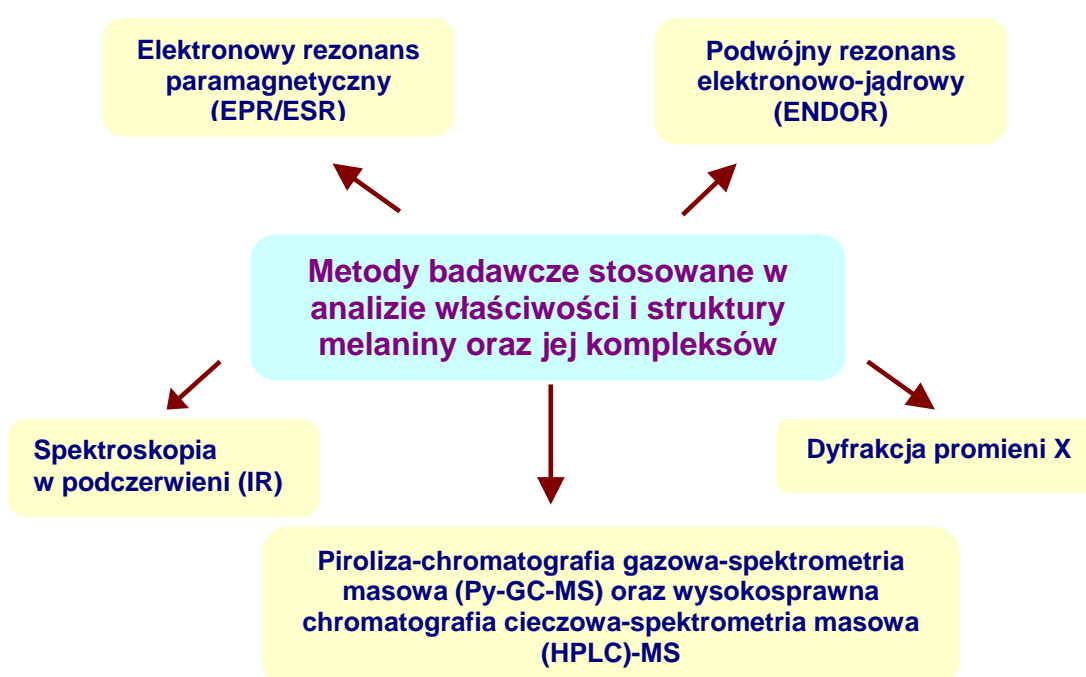


Rys. 13. Agregat melaninowy [33]

Prowadzone są badania zmian strukturalnych w zaproponowanym modelu agregatu syntetycznej melaniny w wyniku dołączenia jonów metalu do polimeru melaninowego [33]. W obecności jonów miedzi(II) zaobserwowano wzrost rozmiarów „prętów” tworzących agregat (rys.13).

1.3. Badania melanin metodą elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR/ESR), podwójnego rezonansu elektronowo-jądrowego (ENDOR) oraz innymi metodami

Rysunek 14 przedstawia metody badawcze najczęściej stosowane do analizy własności fizykochemicznych oraz strukturalnych polimerów melaninowych. Szczególną uwagę zwrócono na metodę EPR/ESR, ponieważ stanowi metodę badawczą wykorzystaną w niniejszej pracy.



Rys. 14. Wybrane metody badawcze stosowane w ocenie właściwości i struktury melanin oraz ich kompleksów

Elektronowy rezonans paramagnetyczny (EPR) jest bardzo przydatną metodą w badaniach melanin ze względu na ich trwałe i silne paramagnetyzm [2-3, 10-11, 17, 23, 26, 32, 34, 37-39, 50-52, 59, 67-68, 81-87]. Melaniny wykazują trwałe paramagnetyzm zarówno w warunkach *in vivo*, jak również *in vitro*. Centra paramagnetyczne stanowią wolne rodniki, w których niesparowane elektrony zlokalizowane są na orto-semichinonowych grupach indolowych stanowiących podjednostki polimeru. Wspomniane centra paramagnetyczne są spułapkowane w sieci polimeru, przez co są niedostępne dla czynników zewnętrznych [2].

Zaobserwowano zmiany koncentracji centrów paramagnetycznych w próbkach melaninowych i parametrów widm EPR rejestrowanych przy różnych pH i w temperaturach z zakresu 100–350 K [37-38].

Różnice między eumelaniną i feomelaniną ujawniają się w widmie EPR obu rodzajów melanin [15, 84]. Widmo EPR eumelaniny stanowi pojedyncza linia. Sygnał EPR pochodzący od feomelanin wykazuje strukturę nadsubtelną wynikającą z obecności siarki w jej strukturze. Znane są również badania kopolimerów melaninowych tzn. melanin typu mieszanego – eu-/feo-melanin [34]. Widma EPR kopolimerów melanin mają kształt złożony.

Pod wpływem wprowadzonych substancji (jony metali, substancje lecznicze) do polimeru melaninowego, obserwuje się zmiany w parametrach rejestrowanych widm EPR [17, 51, 59, 67-68, 81-87] i dlatego technika EPR okazała się bardzo przydatna do oceny efektywności oddziaływań melanina-mniejsza cząsteczka.

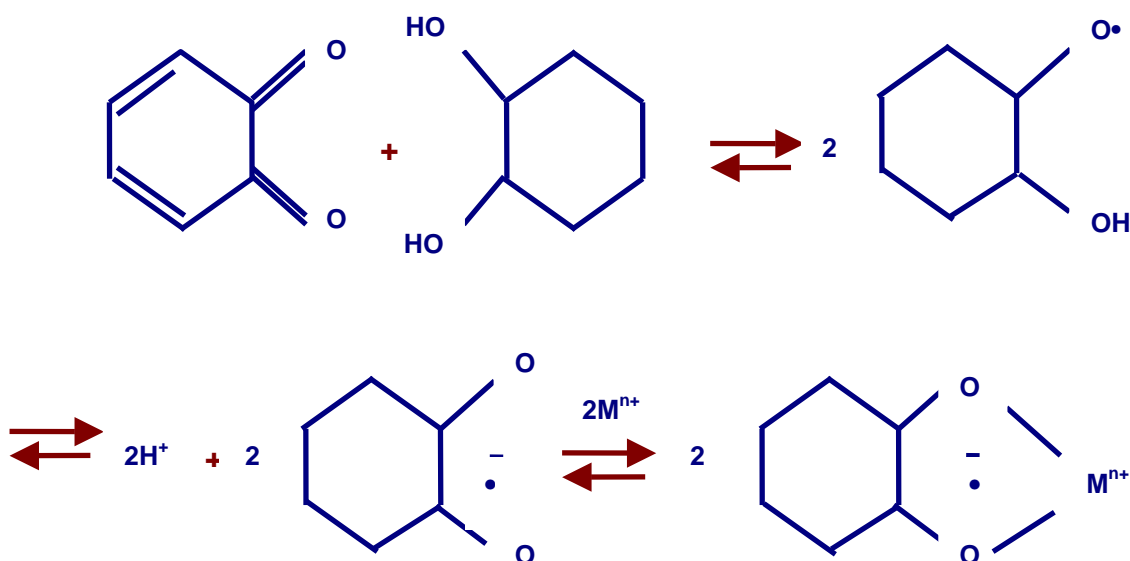
Pod wpływem wprowadzonych jonów paramagnetycznych do polimeru melaninowego, zachodzi zmniejszenie intensywności widma EPR [32]. Jony paramagnetyczne powodują skrócenie czasu relaksacji spin-sieć T_1 oraz spin-spin T_2 [32].

Wprowadzenie jonów diamagnetycznych do melaniny powoduje wzrost intensywności sygnału EPR na skutek indukowania wolnych rodników poprzez przesunięcie równowagi układu chinon-hydrochinon w kierunku form semichinonowych. Powstałe rodniki semichinonowe podlegają stabilizacji przez wiązanie z jonami metali [32] (rys. 15).

Sygnalizowany w tym miejscu problem wpływu jonów metali na układ centrów paramagnetycznych melaniny będzie przedstawiony obszernie w dalszej części pracy (rozdział 4).

Zmiany sygnałów EPR melanin obserwowane są także pod wpływem światła użytego w czasie pomiarów czy obecności tlenu [3, 36, 85]. Naświetlanie melanin prowadzi do wzrostu liczby wolnych rodników w melaninie. Proces ten zależy od intensywności światła, rodzaju melaniny, pH oraz stopnia uwodnienia próbki. Po wyłączeniu źródła światła obserwuje się zanik fotoindukowanego sygnału EPR [3]. Indukowane rodniki ulegają rekombinacji. Proces powstawania rodników pod wpływem światła jest odwracalny w nieobecności tlenu. Pod wpływem tlenu, światło powoduje trwałe zmiany w strukturze melaniny. Rozmiar tego zjawiska zależy także od

długości fali światła, pH, temperatury i rodzaju melaniny. Pod wpływem światła w obecności tlenu następuje jego utlenienie do H_2O_2 i rodnika nadtlenkowego $\bullet OO-R$ [81].



Rys. 15. Proces stabilizacji wolnych rodników poprzez kompleksowanie jonów metali [32]

Do badań oddziaływań dipol-dipolowych centrów paramagnetycznych melanin z ich otoczeniem wykorzystywana jest metoda podwójnego rezonansu elektronowo-jądrowego (ENDOR) [89]. Obserwowano bardzo wąski sygnał ENDOR, co wskazuje na niskie stężenie protonów w otoczeniu wolnych rodników melaniny. Nie wykryto zmian w parametrach sygnału ENDOR po wymianie wody jako medium na wodę deuterowaną D_2O , co wskazuje na brak wymiany protonów z najbliższego otoczenia wolnych rodników melaninowych [89]. Nie zaobserwowano dotychczas sygnału ENDOR świadczącego o istnieniu oddziaływań między centrami paramagnetycznymi a atomami wodoru w melaninie.

Wykorzystując metodę Py-GC/MS uzyskuje się informacje na temat struktury polimerów melaninowych i różnic między nimi w zależności od stosowanego prekursora oraz stężenia i rodzaju jonów metali dodawanych do polimerów melaninowych podczas ich syntezy [39, 60, 71-76]. Metoda ta umożliwia „pocięcie” melaniny na mniejsze cząstki metodą pirolizy (pod wpływem temperatury). Powstałe produkty gazowe rozdzielane są na

chromatografie gazowym i otrzymane rozdzielone cząstki są analizowane metodą spektrometrii masowej MS.

Kolejną metodą stosowaną do badań melanin jest HPLC-MS [1, 90-93]. W metodzie tej melaninę poddaje się destrukcji czynnikami utleniającymi (np. H_2O_2). Powstałe ciekłe produkty rozdzielane są metodą HPLC i następnie analizowane metodą MS. Technikę tę wykorzystuje się także w badaniach różnych barwników roślinnych [94].

Melaniny mają widmo w dalszej podczerwieni IR [28, 32, 95-99]. Ingerencja w strukturę melanin poprzez procesy chemiczne i kompleksowanie z jonami metali wywołuje zmiany w widmie absorpcji w podczerwieni. Pod wpływem dodawania jonów metali do polimeru melaninowego dochodzi do zaniku, wzrostu intensywności lub pojawienia się nowych pasm absorpcji w podczerwieni. Informacje te są wykorzystywane w dyskusji nad strukturą polimerów melaninowych.

Do badań melanin stosuje się także dyfrakcję promieni X [21], spektroskopię fotoelektronową promieniowania X [100] oraz metodę jądrowego rezonansu magnetycznego NMR [101].

1.4. Czynniki kompleksujące stosowane w pracy

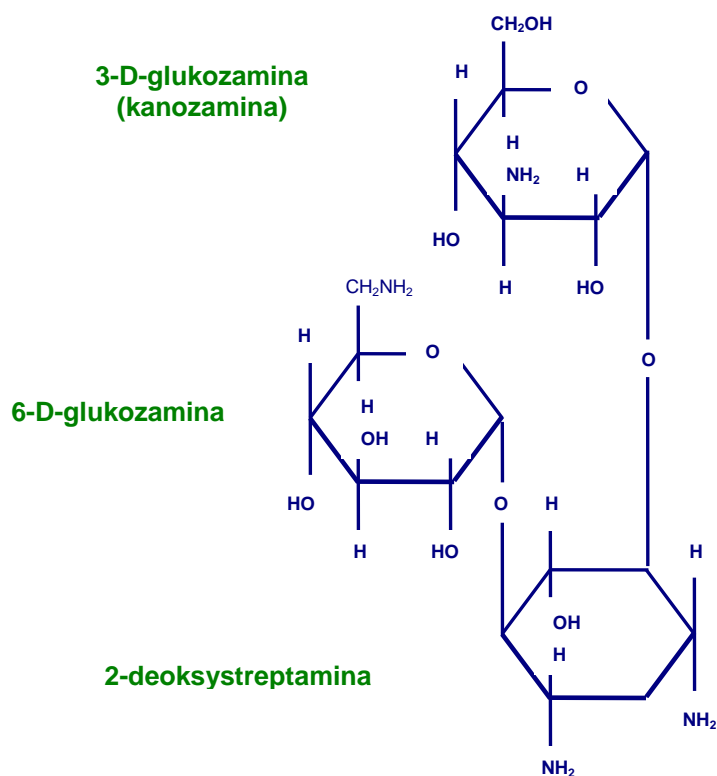
Próbki przygotowane do badań w niniejszej pracy stanowią kompleksy melaniny z kanamycyną i jonami miedzi(II). Wybór leku był podyktowany faktem, iż kanamycyna jest antybiotykiem stosowanym w leczeniu wielu schorzeń i wykazuje powinowactwo do melaniny. Z kolei miedź jest jednym z szerokiej gamy pierwiastkiem chemicznym niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania organizmu ludzkiego.

1.4.1. Własności i zastosowanie kanamycyny

Kanamycyna należy do grupy antybiotyków zwanych aminoglikozydami [102-103]. Mechanizm działania antybiotyków tej grupy polega na hamowaniu syntezy białek bakteryjnych oraz na uszkodzeniu

błony cytoplazmatycznej, co z kolei prowadzi do śmierci komórki w następstwie wypływu niektórych jonów (K^+ , Na^+) niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania komórki bakteryjnej. Aminoglikozydy są skuteczne w zwalczaniu zakażeń dróg moczowych, oddechowych, przewodu pokarmowego, zapalenia opon mózgowych, skóry i kości [44-45], ale wykazują również działanie ototoksyczne polegające na uszkodzeniu narządu słuchu i równowagi znajdujących się w uchu wewnętrznym. Działanie ototoksyczne leku zależne jest od wieku pacjenta (najsilniejszy efekt niepożądany występuje u pacjentów do 3 roku życia oraz powyżej 65 lat), od wcześniej przebytych chorób (uszkodzenie słuchu, odwodnienie), od wysokości dawki i długości kuracji antybiotykowej [104-106].

Kanamycyna, jak wszystkie antybiotyki aminoglikozydowe, składa się z aglikonu (części niesacharydowej), którym najczęściej są aminocyklitole oraz z części sacharydowej, którą stanowią cukry lub aminocukry. Aminocyklitole łączą się glikozydowo (poprzez wiązania glikozydowe) z odpowiednimi sacharydami. Znane są trzy odmiany kanamycyny: A, B i C, przy czym A występuje w największych ilościach. Aminocyklitolem w kanamycynie A jest 2-deoksystreptamina, a część cukrowa składa się z dwóch sacharydów: 3-D-glukozaminy (3-deoksy-3-amino-D-glukozy), zwanej także kanozaminą, oraz 6-D-glukozaminy (6-deoksy-6-amino-D-glukozy). Sacharydy te połączone są wiązaniem α -glikozydowym [103]. Rysunek 16 przedstawia wzór strukturalny kanamycyny A [103]. Kanamycyna jest stosowana w postaci siarczanów dobrze rozpuszczalnych w wodzie. Kanamycyna działa na bakterie Gram-ujemne oraz Gram-dodatnie. Kanamycyna nie wchłania się z przewodu pokarmowego, dlatego należy podawać ją domięśniowo. Mimo toksyczności kanamycyna jest często stosowana tam, gdzie zawodzą inne antybiotyki, np. w zakażeniach szpitalnych spowodowanych bakteriami Gram-ujemnymi.



Rys. 16. Wzór strukturalny kanamycyny A [103]

1.4.2. Rola miedzi w organizmach żywych

Miedź (Cu) jest pierwiastkiem niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania organizmu [107]. Pierwiastek ten bierze udział w procesach oksydacyjno-redukcyjnych pełniąc rolę koenzymu, reguluje metabolizm i transport żelaza. W organizmie zwierzęcym miedź występuje w ceruloplazminie, której niedobór powoduje zatrucie miedzią (choroba Wilsona). Miedź występuje we krwi tworząc kompleksy z histydyną, treoniną, kwasem glutaminowym. Poprzez kompleksy z aminokwasami miedź jest transportowana do wątroby, nerek i jelit. Nadmiar miedzi powoduje zmniejszenie stężenia hemoglobiny, uszkodzenia wątroby i nerek. Wątroba usuwa z krwiobiegu zaabsorbowaną miedź, która może się w niej kumulować, być przenoszona do osocza lub zostać wydalona wraz z żółcią. Miedź jest wydalana głównie z kałem. Wydalanie miedzi odbywa się także z moczem i może ono wzrosnąć w czasie choroby Wilsona. U ludzi ok. 10 %

miedzi podanej dożylnie wydalą się w ciągu 72 godzin z moczem i kałem, co wskazuje, że biologiczny okres półtrwania tego metalu wynosi około kilku tygodni.

Związki miedzi powodują zatrucia ostre jak i przewlekłe [107]. Najbardziej toksyczny jest siarczan miedzi CuSO_4 . Dawka toksyczna dla człowieka wynosi ok. 20 g. Podanie 500 mg powoduje wymioty. Toksyczne jego działanie objawia się w uszkodzeniu wątroby, nerek, w pojawieniu się biegunki czy skurczy jelit. Śmierć następuje po kilku godzinach.

Zatrucia przewlekłe powodują tlenki miedzi (CuO , Cu_2O) powstające w procesach technologicznych [107]. Wchłanianie tych związków prowadzi do zmian w drogach oddechowych (przekrwienie błon śluzowych), nieżyt jelit i żołądka. Związki miedzi powodują również swędzenie skóry, wywołują zapalenie spojówek, zmętnienie i owrzodzenie rogówki, błony śluzowej nosa oraz gardła. Dopuszczalne stężenie miedzi w środowisku pracy wynosi $0,1 \text{ mg/m}^3$.

1.5. Stany trypletowe w układach rodnikowych

Prowadzone są badania, których celem jest określenie zachowania się wolnych rodników zarówno w stanie dubletowym ($S = \frac{1}{2}$), jak i trypletowym ($S = 1$) występujących w układach biologicznych [108–113]. Niektóre prace dotyczą również rodników będących w innych stanach multipletowych.

Znane są z literatury badania EPR stanów termicznie wzbudzonych w węglu oraz w jego macerałach [114]. Analiza otrzymanych wyników wykazała istnienie centrów paramagnetycznych w stanie dubletowym o spinie $S = \frac{1}{2}$ oraz centrów paramagnetycznych w termicznie wzbudzonym stanie trypletowym o spinie $S = 1$.

W neutralnych układach rodnikowych, stan singletowy jest stanem o niższej energii niż stan trypletowy. Dlatego też energia wymiany J ma znak ujemny. Energia wymiany J jest definiowana jako różnica energii ΔE_{ST} między stanem singletowym E_S a trypletowym E_T [113]

$$\Delta E_{ST} = E_S - E_T = J \quad (1)$$

Stany wzbudzone są generowane w procesie chemicznie indukowanej dynamicznej polaryzacji elektronów (CIDEP) [3, 110-111]. Rodnikowe stany trypletowe mogą powstawać w wyniku formowania się par rodnikowych. Wolne rodniki zbliżają się do siebie dając spin całkowity $S = 1$, co odpowiada stanowi trypletowemu.

Badania EPR melanin wykazały zmiany intensywności rejestrowanych linii widmowych, które można przypisać chemicznie indukowanej dynamicznej polaryzacji elektronów [3]. Obserwowany efekt jest związany z generowaniem stanów trypletowych prekursorów fotoindukowanych centrów rodnikowych melaniny.

Pomiary widm EPR melaniny występującej w *Drosophila melanogaster* w zakresie temperatur 100-295 K wykazały występowanie w badanej melaninie naturalnej poza wolnymi rodnikami ($S = \frac{1}{2}$) również centrów paramagnetycznych ($S > \frac{1}{2}$) nie podlegających prawu Curie [115]. W pracy [115] sugerowano występowanie w melaninie termicznie wzbudzonych stanów multipletowych.

2. CEL PRACY

Melaniny wykazują specyficzne właściwości fizykochemiczne: trwały paramagnetyzm, powinowactwo do substancji leczniczych i jonów metali, nierozpuszczalność w rozpuszczalnikach zarówno organicznych jak i nieorganicznych [1, 15, 17]. Ilość chemicznych i fizycznych metod stosowanych do badania struktury biopolimerów melaninowych jest ograniczona z powodu ich nierozpuszczalności.

Ze względu na trwały paramagnetyzm melanin zastosowano w pracy spektroskopię elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) do badań własności i struktury tych polimerów. Metodą EPR możemy analizować bezpośrednio rodzaj, właściwości (oddziaływania spin-spin i spin-sieć) i koncentrację centrów paramagnetycznych w melaninie. Metoda EPR może też być stosowana do testowania otoczenia molekularnego centrów paramagnetycznych. EPR jest metodą nieinwazyjną (nieniszczącą), co pozwala na zachowanie stałego charakteru próbki i wielokrotne jej wykorzystanie podczas pomiarów.

Celem pracy było określenie rodzajów i właściwości centrów paramagnetycznych w kompleksach DOPA-melaniny z kanamycyną i jonami miedzi(II). Analizowano koncentrację i właściwości wolnorodnikowych oraz miedziowych centrów paramagnetycznych. Sprawdzono hipotezę o występowaniu w kompleksach DOPA-melaniny termicznie wzbudzonych stanów trypletowych o spinie $S = 1$.

Substancje lecznicze i jony metali związane z melaniną oddziałują z jej układem centrów paramagnetycznych [10-11, 17, 32, 39, 50-53, 59, 81-83]. Pod wpływem leków i jonów metali zmianie ulega koncentracja centrów paramagnetycznych w melaninie [17, 50-53, 59], co sugeruje znaczącą ich rolę w wiązaniu czynników kompleksujących do polimeru. Charakter oddziaływań melanin z lekami i jonami metali wymaga dalszych badań, ponieważ nie jest on dokładnie określony. Szczególnie duże powinowactwo do melaniny wykazuje kanamycyna, która jest typowym lekiem aminoglikozydowym. Z medycznego punktu widzenia znajomość oddziaływań kanamycyny (antybiotyku) z melaniną jest bardzo istotna,

ponieważ związana z melaniną kanamycyna w przypadku przedłużonego działania na organizm ludzki wywołuje efekty ototoksyczne [17, 30, 104-105].

W celu uzyskania pełniejszych informacji o naturze centrów paramagnetycznych w badanych kompleksach przeprowadzono pomiary temperaturowe widm EPR w zakresie 100–300 K. Analizowano zależności temperaturowe widm EPR w celu sprawdzenia hipotezy o istnieniu w DOPA-melaninie i badanych kompleksach, oprócz centrów paramagnetycznych o spinie $S = \frac{1}{2}$, spełniających prawo Curie, dodatkowego rodzaju centrów paramagnetycznych wzbudzonych termicznie o spinie $S = 1$, nie spełniających prawa Curie. Przeprowadzono dyskusję modelu występowania w badanych próbkach stanów dubletowych o spinie $S = \frac{1}{2}$ przy jednoczesnym występowaniu termicznie wzbudzonych stanów trypletowych o spinie $S = 1$.

3. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

3.1. Otrzymywanie i charakterystyka próbek

Próbki oraz oznaczenia ilościowe wiązania czynników kompleksujących do melaniny wykonano w Katedrze i Zakładzie Chemii i Analizy Leków Wydziału Farmaceutycznego w Sosnowcu Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach.

Do badań przygotowano zestaw 17 próbek. Próbki te stanowi DOPA-melanina będąca próbką kontrolną oraz jej kompleksy z kanamycyną - antybiotykiem aminoglikozydowym oraz z paramagnetycznymi jonami miedzi(II). Przygotowane próbki zróżnicowane są pod względem kolejności kompleksowania leku i jonów miedzi(II) oraz pod względem stężeń roztworów chlorku miedzi CuCl_2 użytych podczas przeprowadzanych syntez.

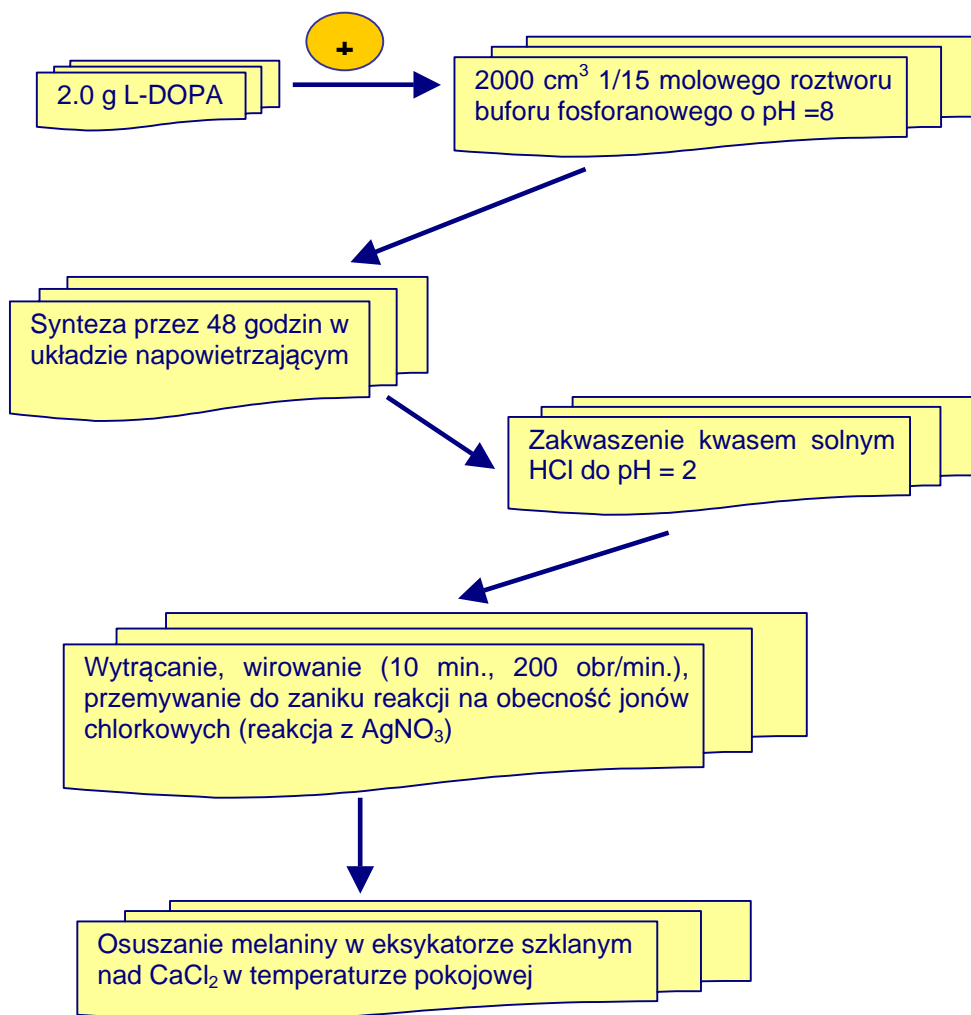
3.1.1. Synteza DOPA-melaniny

Syntezę DOPA-melaniny przeprowadzono według przepisu [116]:

I) Przygotowanie 1/15 molowego buforu fosforanowego o $\text{pH} = 8$

47,7334 g wodorofosforanu disodowego $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$, przeniesiono do kolby o pojemności 2000 cm^3 i uzupełniono wodą destylowaną do kreski – otrzymano 1/15 molowy roztwór wodorofosforanu disodowego. 9,0666 g diwodorofosforanu potasu KH_2PO_4 , przeniesiono do kolby o pojemności 1000 cm^3 i uzupełniono wodą destylowaną do kreski – otrzymano 1/15 molowy roztwór diwodorofosforanu potasu. Następnie zmieszano 1900 cm^3 Na_2HPO_4 oraz 100 cm^3 KH_2PO_4 i otrzymano 2000 cm^3 1/15 molowego buforu fosforanowego o $\text{pH} = 8$.

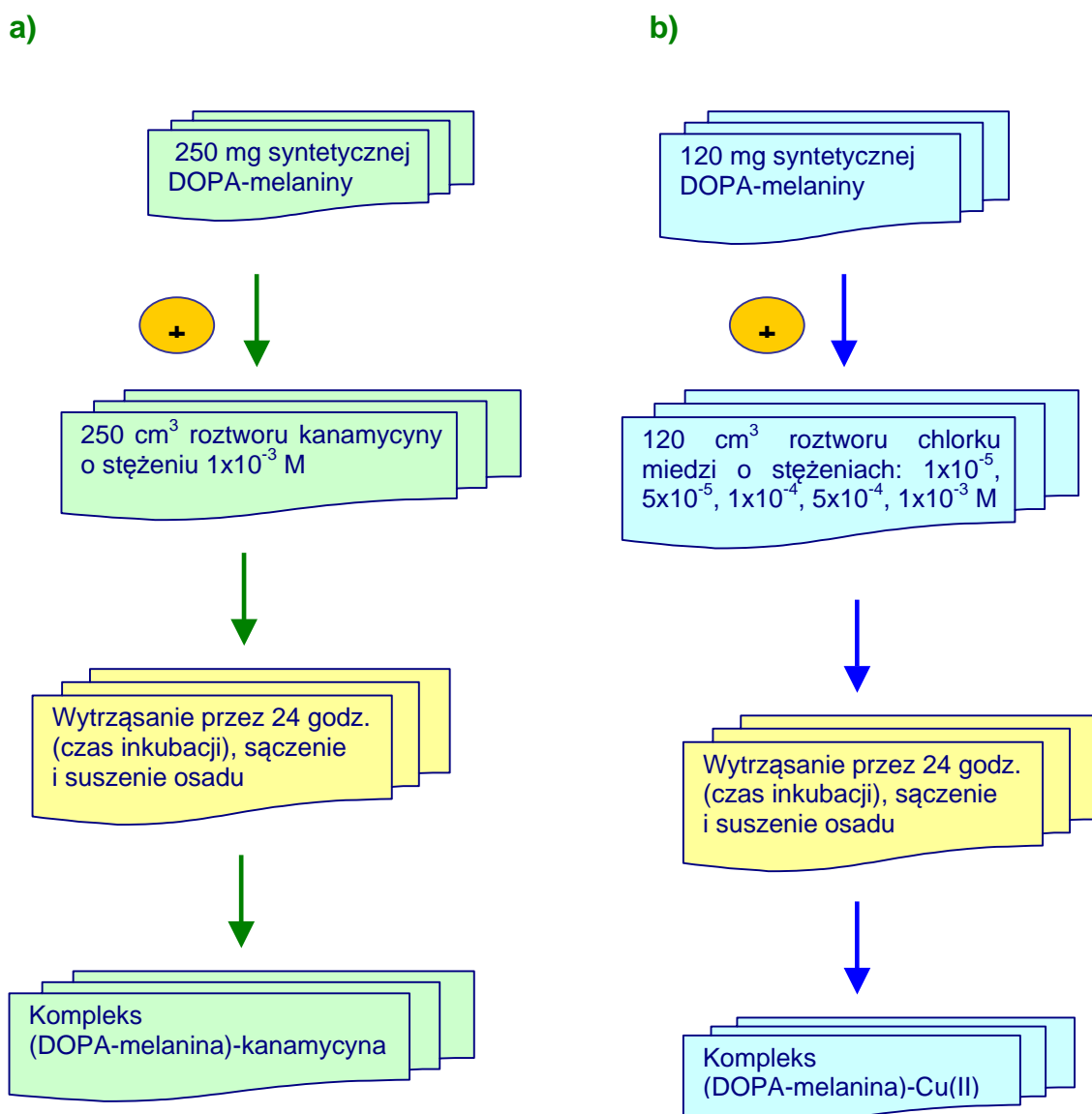
II) Otrzymywanie syntetycznej DOPA-melaniny (rys. 17)



Rys. 17. Schemat otrzymywania syntetycznej DOPA-melaniny

3.1.2. Kompleksy (DOPA-melanina)-kanamycyna oraz (DOPA-melanina)-Cu(II)

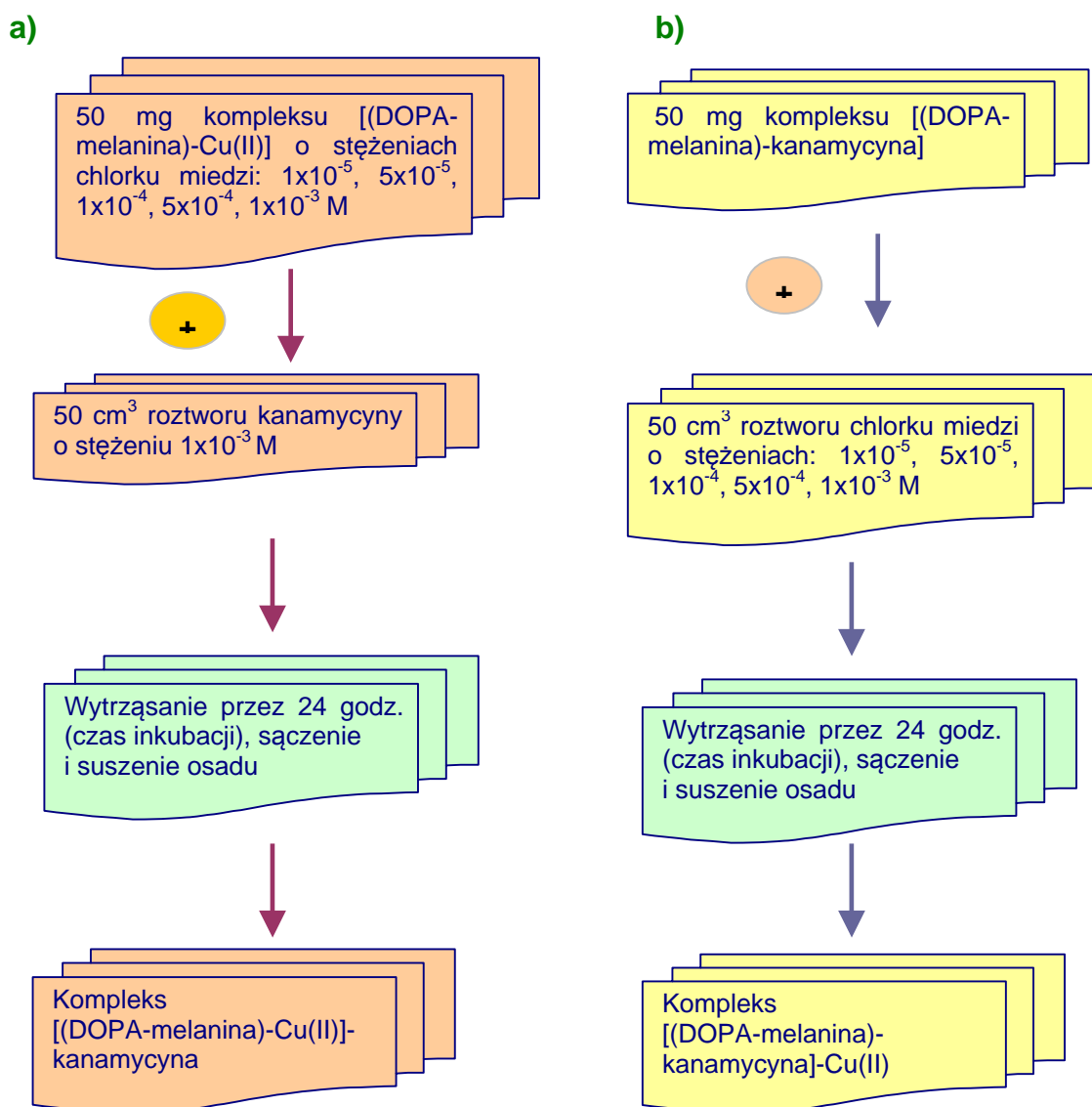
Kompleksy (DOPA-melanina)-kanamycyna oraz (DOPA-melanina)-Cu(II) otrzymano według procedur przedstawionych poniżej (rys. 18).



Rys. 18. Schemat otrzymywania kompleksów a) (DOPA-melanina)-kanamycyna oraz b) (DOPA-melanina)-Cu(II)

3.1.3. Kompleksy [(DOPA-melanina)-kanamycyna]-Cu(II) oraz [(DOPA-melanina)-Cu(II)]-kanamycyna

Kompleksy [(DOPA-melanina)-kanamycyna]-Cu(II) oraz [(DOPA-melanina)-Cu(II)]-kanamycyna otrzymano według procedur przedstawionych poniżej (rys. 19).



Rys. 19. Schemat otrzymywania kompleksów a) [(DOPA-melanina)-Cu(II)]-kanamycyna oraz b) [(DOPA-melanina)-kanamycyna]-Cu(II)

3.1.4. Badania ilościowe wiązania czynników kompleksujących do melaniny

Do ilościowego oznaczenia antybiotyku wykorzystano spektrofotometr UV-VIS firmy Jasco, model V-530, zaś w celu oznaczenia ilości związanych jonów metalu wykorzystano spektrometr absorpcji atomowej firmy Carl Zeiss, Jena typ AAS 3. Próbkki kontrolne, nie zawierające jonów metalu i leku stanowiły próby odniesienia. Ilość związanego z melanicą czynnika kompleksującego oznaczono przez pomiar absorbancji roztworów wzorcowych o znanym stężeniu, odpowiednio substancji leczniczej lub jonów metalu oraz supernatantów po odsączeniu kompleksów [117]. Ilość związanej substancji z melanicą wyznaczono jako różnicę pomiędzy ilością domieszki wprowadzonej i ilością substancji oznaczonej w supernatancie. Ilość związanej substancji leczniczej i jonów metalu wyrażono w $\mu\text{molach/mg}$ melaniny.

Do spektrofotometrycznego oznaczenia kanamycyny przygotowano bufor boranowy o $pH = 9$ oraz 2, 2 mM roztwór chloranilu w etanolu.

l) Przygotowanie buforu boranowego o $pH = 9$

12,404 g kwasu borowego H_3BO_3 oraz 2,892 g chlorku sodu $NaCl$ przeniesiono do kolby o pojemności 1000 cm^3 i uzupełniono wodą destylowaną do kreski – otrzymano 0,2 molowy roztwór kwasu borowego. 19,108 g boraksu $Na_2B_4O_7 \cdot 10 H_2O$ przeniesiono do kolby o pojemności 1000 cm^3 i uzupełniono wodą destylowaną do kreski – otrzymano 0,05 M roztwór boraksu. Następnie zmieszano 200 cm^3 0,2 M roztworu kwasu borowego oraz 800 cm^3 0,05 M roztworu boraksu i otrzymano 1000 cm^3 buforu boranowego o $pH = 9$.

II) Przygotowanie 2,2 mM roztworu chloranilu w etanolu

0,27047 g chloranilu przeniesiono do kolby o pojemności 500 cm³ i uzupełniono do kreski bezwodnym alkoholem etylowym i otrzymano 2,2 mM roztwór chloranilu w etanolu

Do probówek o pojemności 20 cm³ przenoszono ilościowo 2 cm³ 2,2 mM roztworu chloranilu w etanolu, 2 cm³ buforu boranowego o $pH = 9$, oraz 1 cm³ supernatantu zawierającego nie związany lek i 5 cm³ wody destylowanej. Tak przygotowane roztwory ogrzewano przez 10 minut na łaźni wodnej w temperaturze 65 °C. Następnie pozostawiono probówki do ochłodzenia do temperatury pokojowej. Po oziębieniu roztworów mierzono absorbancję w 1-cm kuwetach przy długości fali $\lambda = 350$ nm względem próby ślepej.

3.1.5. Zestawienie badanych próbek

Tabela 1 zawiera zestaw próbek zbadanych w niniejszej pracy.

Tabela 1. Zestaw próbek przygotowanych do badań. W tabeli podano pełne i skrócone nazwy próbek. Stężenie kanamycyny wynosiło 1×10^{-3} M. Stężenie dodawanych jonów miedzi(II) wynosiło [M]: 1×10^{-5} , 5×10^{-5} , 1×10^{-4} , 5×10^{-4} , 1×10^{-3} .

* - próbki różnią się kolejnością kompleksowania

Próbka	Nazwa skrócona
DOPA-melanina	mel
(DOPA-melanina)-kanamycyna	mel+kan
(DOPA-melanina)-Cu(II)	mel+Cu
[(DOPA-melanina)-kanamycyna]-Cu(II)	mel+kan+Cu*
[(DOPA-melanina)-Cu(II)]-kanamycyna	mel+Cu+kan*

Wprowadzono skrótowe oznaczenia próbek (Tabela 1), które będą używane w dalszej części pracy.

3.1.6. Ilość kanamycyny i jonów miedzi(II) związanych z melaniną

Ilości kanamycyny i jonów miedzi(II) związanych z melaniną, wyznaczone według metodyki opisanej w rozdziale 3.1.4. zamieszczono w tabeli 2.

Tabela 2. Ilości związanego leku oraz jonów miedzi(II) w kompleksach melaniny. Stężenie leku w roztworze wynosiło 1×10^{-3} M. Stężenie jonów miedzi(II) w roztworze podane jest w tabeli.

Kompleks	Stężenie dodawanych jonów Cu(II) [M]	Ilość kanamycyny i jonów miedzi(II) związanych z melaniną [μmol/mg]	
		kanamycyna	jony Cu(II)
mel+kan	-	0,4278	-
mel+Cu	1×10^{-5}	-	0,0094
	5×10^{-5}	-	0,0432
	1×10^{-4}	-	0,0811
	5×10^{-4}	-	0,3346
	1×10^{-3}	-	0,5181
mel+Cu+kan	1×10^{-5}	0,2096	0,0082
	5×10^{-5}	0,1886	0,0426
	1×10^{-4}	0,1623	0,0801
	5×10^{-4}	0,0678	0,3338
	1×10^{-3}	0,0520	0,5175
mel+kan+Cu	1×10^{-5}	0,4051	0,0009
	5×10^{-5}	0,4031	0,0031
	1×10^{-4}	0,3997	0,0064
	5×10^{-4}	0,3955	0,0108
	1×10^{-3}	0,3907	0,0227

3.1.7. Zastosowane odczynniki chemiczne

W pracy zastosowano następujące odczynniki chemiczne:

1. Alkohol etylowy bezwodny cz. d. a. C_2H_5OH , POCh Gliwice
2. Chloranil (2,3,5,6-tetrachloro-1,4-benzochinon), BUSCH FLUKA AG
3. Diwodorofosforan (V) potasu cz. d. a. KH_2PO_4 , POCh Gliwice
4. Kwas borowy cz. d. a. H_3BO_3 , POCh Gliwice
5. L-DOPA (L-3,4-dihydroksyfenyloalanina), SIGMA CHEMICAL USA
6. Tetraboran sodu (boraks) $Na_2B_4O_7 \cdot 10 H_2O$, POCh Gliwice
7. Wodorofosforan(V) disodowy cz. d. a. $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$, POCh Gliwice
8. Chlorek miedzi(II) $CuCl_2 \cdot 2 H_2O$, POCh Gliwice
9. Azotan(V) srebra $AgNO_3$, POCh Gliwice
10. Chlorek wapnia $CaCl_2$, POCh Gliwice
11. Siarczan kanamycyny (kanamycin A monosulfate), SIGMA CHEMICAL, USA

3.2. Spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) jako metoda badawcza zastosowana w pracy

Pomiary i analizy metodą elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) w temperaturze pokojowej wykonano w Katedrze i Zakładzie Fizyki Medycznej Wydziału Farmaceutycznego Śląskiej Akademii Medycznej w Sosnowcu.

Pomiary temperaturowe w zakresie 100–300 K metodą EPR przeprowadzono w Zakładzie Spektroskopii Rezonansów Magnetycznych Instytutu Fizyki Uniwersytetu Zielonogórskiego. Analizy numeryczne zależności temperaturowych parametrów widm EPR wykonano na Wydziale Farmaceutycznym Śląskiej Akademii Medycznej.

3.2.1. Przebieg pomiarów EPR

Pomiary wykonano za pomocą spektrometrów EPR typu S/EX produkcji RADIOPAN, Poznań (rys. 20). Widma EPR zapisano w postaci pierwszej pochodnej absorpcji. Zastosowano promieniowanie mikrofalowe z zakresu pasma X o częstotliwości 9.3 GHz (pomiary w temperaturze pokojowej) i 9.4 GHz (pomiary w temperaturze 100-300 K) oraz modulację pola magnetycznego 100 kHz. Częstotliwość promieniowania mikrofalowego rejestrowano miernikiem typu MCM produkcji EPRAD, Poznań.

Pomiary widm EPR w zależności od mocy mikrofalowej w zakresie 0.7–70 mW dla wszystkich badanych próbek przeprowadzono w celu obserwacji zjawiska nasycenia mikrofalowego. Widma EPR rejestrowano przy tłumieniu zmieniającym się w zakresie od 20 do 0 dB.



Rys. 20. Spektrometr EPR typu S/EX na pasmo X, RADIOPAN Poznań

Moc mikrofalową wyrażono w jednostkach względnych jako P/P_0 , korzystając ze wzoru określającego tłumienie układu w decybelach:

$$\text{Tłumienie [dB]} = 10 \log (P_0/P) \quad (2)$$

gdzie:

- P_0 - moc promieniowania mikrofalowego wytwarzanego przez klistron
- P - moc promieniowania mikrofalowego stosowana podczas pomiaru EPR (po przejściu przez tłumik)

Dla badanych widm EPR wyznaczono amplitudę A , intensywność I , szerokość linii ΔB_{pp} , oraz współczynnik rozszczepienia spektroskopowego g . Współczynnik g wyznaczono ze wzoru [118]:

$$g = \frac{h\nu}{\beta B_r} \quad (3)$$

gdzie:

- h - stała Plancka
- β - magneton Bohra
- ν - częstotliwość promieniowania mikrofalowego
- B_r - rezonansowa indukcja magnetyczna

3.2.2. Wyznaczanie koncentracji centrów paramagnetycznych

Koncentrację centrów paramagnetycznych N w badanych próbkach wyznaczono według wzoru:

$$N = n_u \frac{P_p / A_{rp} W_p m_p}{P_u / A_{ru} W_u} \quad (4)$$

gdzie:

- n_u - ilość centrów paramagnetycznych w próbce ultramaryny (ultramarynę zastosowano jako wzorzec koncentracji centrów paramagnetycznych)
- P_p, P_u - pole powierzchni pod krzywą absorpcji rezonansowej próbki i ultramaryny
- A_{rp}, A_{ru} - maksymalna amplituda sygnału EPR rubinu, rejestrowanego przy tym samym wzmacnieniu dla próbki i ultramaryny
- W_p, W_u - wzmacnienie sygnału EPR dla próbki i ultramaryny
- m_p - masa próbki

Dodatkowo użyto kryształu rubinu jako wzorca wewnętrznego w celu uniknięcia wpływu warunków pomiarów na otrzymane wyniki.

3.2.3. Analiza kształtu linii EPR

Analiza kształtu linii EPR dostarcza informacji o charakterze oddziaływań między centrami paramagnetycznymi w badanym ciele stałym [119-124]. W spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego rozważa się linie o kształcie gaussowskim bądź lorentzowskim [130-131]. Wykazano, że w przypadku oddziaływania spin-spin, przy braku oddziaływania wymiennego, linia EPR opisana jest krzywą typu gaussowskiego. Jeżeli natomiast zachodzi wymiana elektronowa, linia EPR opisana jest zarówno krzywą typu gaussowskiego jak i lorentzowskiego. Obie krzywe aproksymują linie EPR w odpowiednich zakresach pola magnetycznego. Środek linii w przypadku zjawiska wymiany jest opisany krzywą lorentzowską. Brzegi linii opisuje krzywa gaussowska.

3.2.4. Badania wpływu mocy mikrofalowej na widma EPR

Intensywność i szerokość linii EPR zależą od mocy mikrofalowej [118, 127]. Zależności te są różne dla linii EPR poszerzonej jednorodnie i niejednorodnie.

Sygnal absorpcji rezonansowej Y oraz jej pierwsza pochodna Y' dla linii poszerzonej jednorodnie o kształcie krzywej Lorentza opisane są następująco [118]:

$$Y = \frac{1}{\pi} \frac{B_1 T_2}{1 + (B - B_r)^2 \gamma^2 T_2^2 + B_1^2 \gamma^2 T_1 T_2} \quad (5)$$

$$Y' = -\frac{2}{\pi} \frac{B_1 T_2^3 \gamma^2 (B - B_r)}{[1 + (B - B_r)^2 \gamma^2 T_2^2 + B_1^2 \gamma^2 T_1 T_2]^2} \quad (6)$$

gdzie:

B_1 - amplituda indukcji mikrofalowego pola magnetycznego

B - indukcja magnetyczna

B_r - rezonansowa indukcja magnetyczna

T_1 - czas relaksacji podłużnej (spin-sieć)

T_2 - czas relaksacji poprzecznej (spin-spin)

Wielkość γ wyrażona jest jako:

$$\gamma = \frac{2\pi g \beta}{h} \quad (7)$$

gdzie:

g - współczynnik rozszczepienia spektroskopowego

β - magneton Bohra

h - stała Plancka

W przypadku linii poszerzonej jednorodnie o kształcie lorentzowskim, gdy $B_1^2 \gamma^2 T_1 T_2 \ll 1$, efekt nasycenia jest do zaniedbania i amplituda sygnału EPR jest proporcjonalna do pola B_1 (lub do $P_0^{1/2}$). Natomiast dla $B_1^2 \gamma^2 T_1 T_2 \gg 1$ linia absorpcji jest silnie nasycona i obserwowany jest spadek amplitudy sygnału EPR wraz ze wzrostem mocy mikrofalowej użytej w czasie pomiaru. Dla mocy mikrofalowej, przy której zarejestrowana jest maksymalna amplituda sygnału EPR, czas relaksacji spin-sieć T_1 dany jest wzorem [118]:

$$T_1 = \frac{1}{2B_1^2 \gamma^2 T_2} \quad (8)$$

a szerokość linii ΔB_{pp} wyrażona jest jako

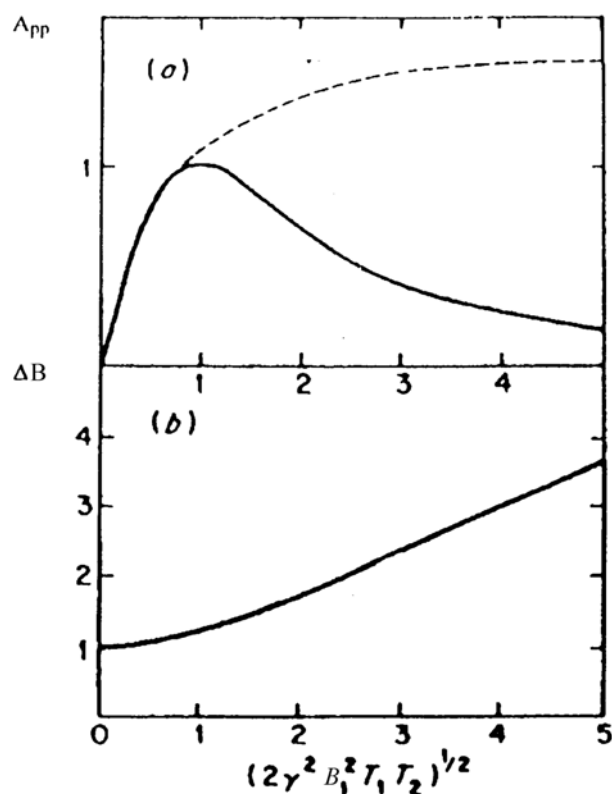
$$(\Delta B_{pp})^2 = \frac{4}{3\gamma^2 T_2^2} + \frac{4B_1^2 T_1}{3T_2} \quad (9)$$

Wzrost szerokości linii lorentzowskiej ze wzrostem mocy mikrofalowej spowodowany jest przez wydłużenie czasu relaksacji spin-sieć T_1 . Kiedy amplituda sygnału EPR osiąga maksimum, szerokość linii wzrasta jedynie 1,2 razy w porównaniu z szerokością linii w warunkach braku nasycenia mikrofalowego [118].

Dla linii poszerzonej niejednorodnie o kształcie gaussowskim, amplituda sygnału EPR wzrasta wraz ze wzrostem mocy mikrofalowej P_0 do osiągnięcia maksymalnej wartości, po czym nie ulega już zmianie.

Szerokość linii EPR poszerzonej niejednorodnie nie zmienia się wraz ze wzrostem mocy mikrofalowej.

Omówiony powyżej wpływ mocy mikrofalowej na amplitudę i szerokość linii EPR przedstawia rys. 21 [118].



Rys. 21.

a) Zależność maksymalnej amplitudy A_{pp} ($A_{pp} = Y'_{max}/Y'_{max}(B_1 \rightarrow 0)$) pierwszej pochodnej sygnału absorpcji rezonansowej od amplitudy mikrofalowego pola magnetycznego B_1 ($B_1 \sim P^{1/2}$) w przypadku linii poszerzonej jednorodnie (—) i niejednorodnie (---)

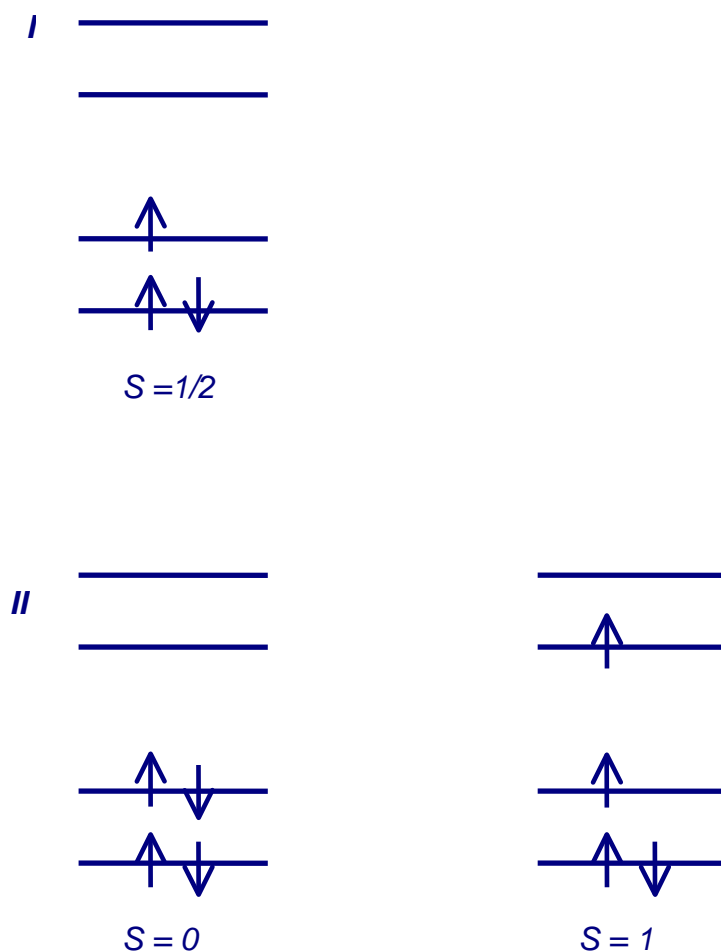
b) Zależność szerokości ΔB ($\Delta B = \Delta B_{pp}/[\Delta B_{pp}(B_{pp} \rightarrow 0)]$) linii poszerzonej jednorodnie, zarejestrowanej w postaci pierwszej pochodnej sygnału absorpcji rezonansowej, od amplitudy mikrofalowego pola magnetycznego B_1 ($B_1 \sim P^{1/2}$) [118]

3.2.5. Badania wpływu temperatury pomiaru na intensywność i szerokość linii EPR

Przeprowadzono pomiary EPR w zakresie temperatur 100–300 K dla pięciu wybranych próbek (DOPA-melanina, (DOPA-melanina)-kanamycyna, (DOPA-melanina)-Cu(II), [(DOPA-melanina)-Cu(II)]-kanamycyna, [(DOPA-melanina)-kanamycyna]-Cu(II)), dla stężenia jonów miedzi(II) 1×10^{-3} M). Celem pomiarów temperaturowych było wykazanie, czy w badanych próbkach, oprócz centrów paramagnetycznych spełniających prawo Curie, istnieją centra paramagnetyczne ulegające termicznemu wzbudzeniu w wybranym zakresie temperatur.

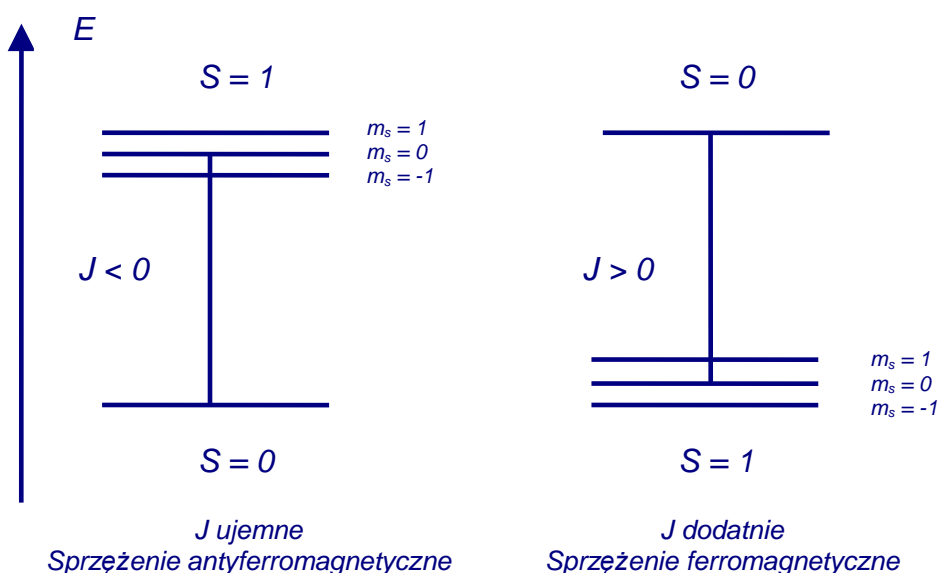
Znane z literatury naukowej badania EPR różnych substancji paramagnetycznych, wykazały możliwość występowania dwojakiemu rodzaju zależności intensywności linii EPR od temperatury [126]. Zaobserwowano, z jednej strony niezmiennosc (stałą wartością), a z drugiej strony zależność intensywności linii EPR od temperatury pomiaru. W substancjach paramagnetycznych, w których istnieje kilka grup centrów paramagnetycznych, każda grupa wykazuje charakterystyczne zachowanie w zależności od temperatury pomiaru [126].

Rysunek 22 przedstawia, zgodnie z literaturą [118, 130-131], model poziomów energetycznych dla jednoczesnego występowania w próbce stanów o spinie $S = \frac{1}{2}$ oraz o spinie $S = 1$.



Rys. 22. Model poziomów energetycznych przy jednoczesnym występowaniu (I) stanów dubletowych $S = \frac{1}{2}$ oraz (II) podstawowego stanu singletowego $S = 0$ i wzbudzonych stanów trypletowych $S = 1$

Oddziaływanie wymienne między dwoma centrami paramagnetycznymi o spinie $S = \frac{1}{2}$ prowadzi do powstania stanu singletowego, $S = 0$, lub stanu trypletowego, $S = 1$ [126]. Różnicę energii między stanem trypletowym i singletowym wyraża energia wymiany J (rys. 23). Dla ujemnych wartości J (sprzężenie antyferromagnetyczne), wraz z obniżaniem temperatury pomiaru obserwuje się spadek intensywności linii EPR. Dla dodatnich wartości J (sprzężenie ferromagnetyczne) obserwowany jest natomiast wzrost intensywności linii EPR wraz z obniżaniem temperatury pomiaru.



Rys. 23. Rozszczepienie singlet-tryplet dla dwóch sprzężonych wymiennie centrów paramagnetycznych o spinach $S = \frac{1}{2}$ w przypadku dodatnich i ujemnych wartości J [126]

Prawo Curie

$$\chi = \frac{C}{T} \quad (10)$$

gdzie:

χ - podatność magnetyczna

C - stała

T - temperatura

przedstawiającę temperaturową zależność podatności magnetycznej opisuje układ centrów paramagnetycznych o spinie $S = \frac{1}{2}$. Ponieważ intensywność widma EPR jest proporcjonalna do podatności magnetycznej [128] badanej próbki prawo Curie można zapisać w postaci

$$I = \frac{C}{T} \quad (11)$$

gdzie I oznacza intensywność sygnału EPR.

W próbkach wykazujących odstępstwo od zależności $IT = C$, oprócz centrów paramagnetycznych o spinie $S = \frac{1}{2}$, mogą występować także centra paramagnetyczne w termicznie wzbudzonym stanie trypletowym o spinie $S = 1$. Całkowita intensywność sygnału EPR takich układów jest sumą intensywności pochodzącej od stanów o spinie $S = \frac{1}{2}$ oraz intensywności pochodzącej od stanów termicznie wzbudzonych o spinie $S = 1$.

Przebieg zależności IT od temperatury pozwala bezpośrednio stwierdzić, czy prawo Curie jest spełnione czy też nie, w wybranym zakresie temperatur. Na rysunku 24 i 25 przedstawiono, oprócz temperaturowej zależności intensywności I linii EPR, zależność temperaturową iloczynu IT intensywności I i temperatury pomiaru T dla centrów paramagnetycznych w termicznie wzbudzonym stanie trypletowym o spinie $S = 1$.

Równanie opisujące iloczyn intensywności oraz temperatury IT dla termicznie wzbudzonych stanów o spinie $S = 1$ ma postać [129]:

$$IT = \frac{B}{3 + \exp(J/kT)} \quad (12)$$

gdzie:

I – intensywność sygnału EPR

T – temperatura pomiaru

J – energia wzbudzenia singlet-tryplet

k – stała Boltzmana

B – stała

Wykresy zależności $I = f(T)$, $IT = f(T)$, $I = f(1/T)$, oraz $IT = f(1/T)$

sporządzono zgodnie ze wzorami $I = \frac{B}{T(3 + \exp(J/kT))}$ oraz

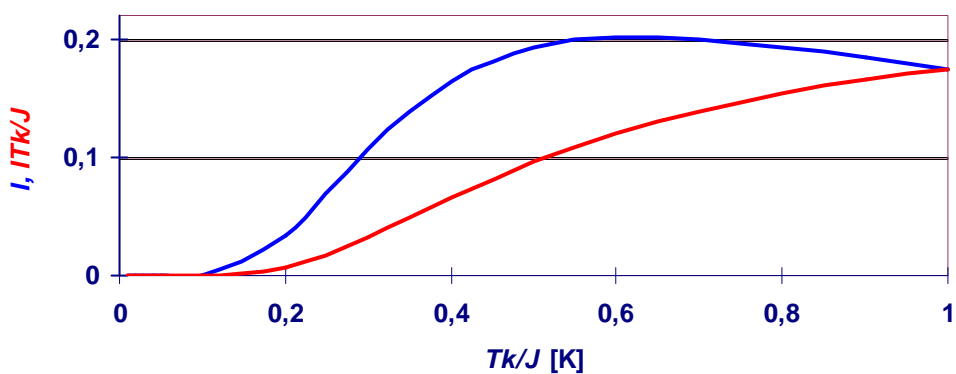
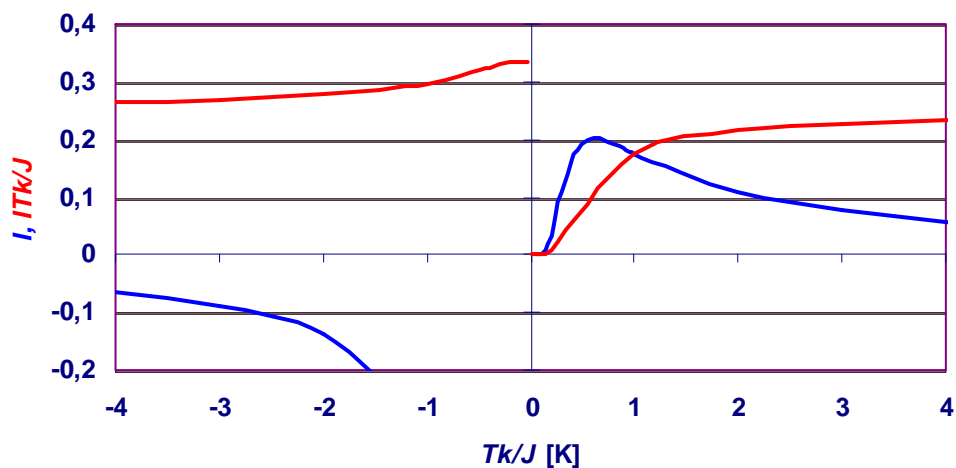
$$IT = \frac{B}{3 + \exp(J/kT)} \quad (\text{rys. 24-25}).$$

Wprowadzono następujące układy współrzędnych:

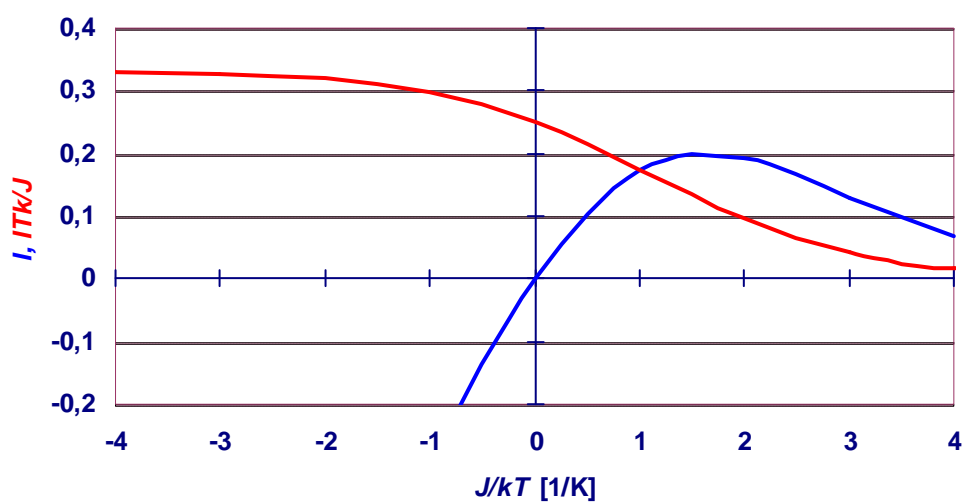
1. Oś rzędnych I lub ITk/J , oś odciętych: Tk/J (wykresy $I = f(T)$ oraz $IT = f(T)$)
2. Oś rzędnych : I lub ITk/J , oś odciętych: J/kT (wykresy $I = f(1/T)$ oraz $IT = f(1/T)$).

Całkowity iloczyn IT będący sumą iloczynów pochodzących od centrów paramagnetycznych o spinie $S = \frac{1}{2}$ oraz o spinie $S = 1$ opisany jest

$$\text{równaniem } IT = C + \frac{B}{3 + \exp(J/kT)} \quad (13)$$



Rys. 24. Wykres zależności intensywności I oraz iloczynu IT od temperatury dla centrów paramagnetycznych we wzbudzonym termicznie stanie trypletowym o spinie $S = 1$ oraz powiększony fragment tego wykresu. Wykres narysowano dla wartości $B = 1$.



Rys. 25. Wykres zależności intensywności I oraz iloczynu IT od odwrotności temperatury dla centrów paramagnetycznych we wzbudzonym termicznie stanie trypletowym o spinie $S = 1$. Wykres narysowano dla wartości $B = 1$.

Szerokość linii EPR jest uwarunkowana czasem relaksacji spin-sieć T_1 oraz czasem relaksacji spin-spin T_2 [119-120]. Czas relaksacji T_1 uwarunkowany jest temperaturą pomiaru, natomiast czas T_2 nieznacznie zmienia się z temperaturą. Czas T_2 zależy od koncentracji centrów paramagnetycznych. Badania temperaturowej zależności szerokości linii EPR pozwalają określić, czy w badanej próbce przeważają oddziaływania spin-sieć, czy spin-spin. W niskich temperaturach szerokość linii uwarunkowana jest oddziaływaniem spin-spin (niskie temperatury zmniejszają oddziaływanie typu spin-sieć).

4. WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA WYNIKÓW

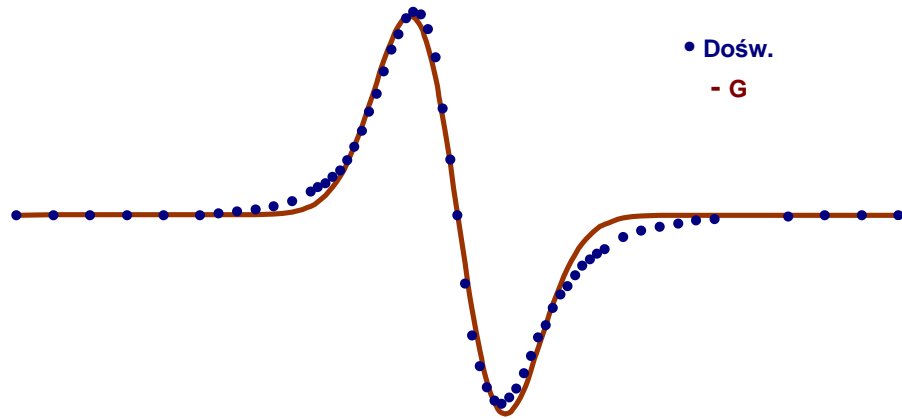
4.1. Widmo EPR DOPA-melaniny oraz parametry widm EPR badanych kompleksów

W niniejszym rozdziale zastosowano skrócone nazwy badanych próbek (rozdział 3, Tabela 1).

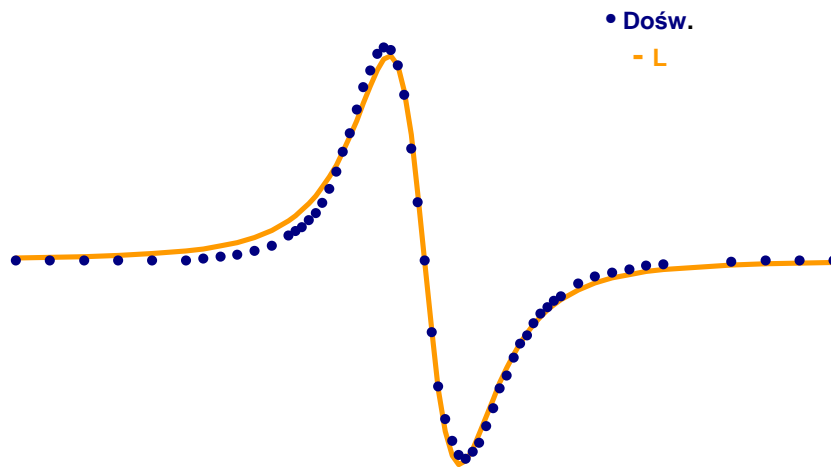
4.1.1. Kształt linii EPR DOPA-melaniny

Przeprowadzono analizę kształtu widma EPR DOPA-melaniny. Widmo EPR DOPA-melaniny, zarejestrowane przy niskiej mocy mikrofalowej w celu uniknięcia zjawiska nasycenia mikrofalowego, jest asymetryczne. Asymetria widma EPR może być spowodowana anizotropią współczynnika rozszczepienia spektroskopowego g lub wieloskładnikowością tego widma, ponieważ mogą istnieć dwie formy tautomeryczne wolnych rodników melaninowych (rozdział 1.2). Można założyć również, że asymetria widma EPR melaniny spowodowana jest istnieniem centrów paramagnetycznych w stanie dubletowym o spinie $S = \frac{1}{2}$ oraz w stanie trypletowym o spinie $S = 1$. Składnik widma w stanie trypletowym pojawia się w zależności temperaturowej $IT = f(T)$ i jest niewidoczny w niskich temperaturach. Zależność temperaturowa IT została zbadana na podstawie głównej linii i jak wykazano w dalszej części pracy, w głównej linii istnieją składniki widma w stanie dubletowym i trypletowym.

W pierwszym kroku dokonano dopasowania krzywej doświadczalnej krzywą gaussowską oraz krzywą lorentzowską. Otrzymane rezultaty pokazują, że żadna z dwóch wymienionych krzywych nie dopasowuje krzywej doświadczalnej w zadowalającym stopniu (rys. 26-27). Jako wskaźnika dopasowania użyto współczynnika χ^2 (im mniejsza wartość χ^2 , tym lepsze dopasowanie).



Rys. 26. Dopasowanie widma EPR DOPA-melaniny krzywą gaussowską, $\chi^2 = 0,1293$.

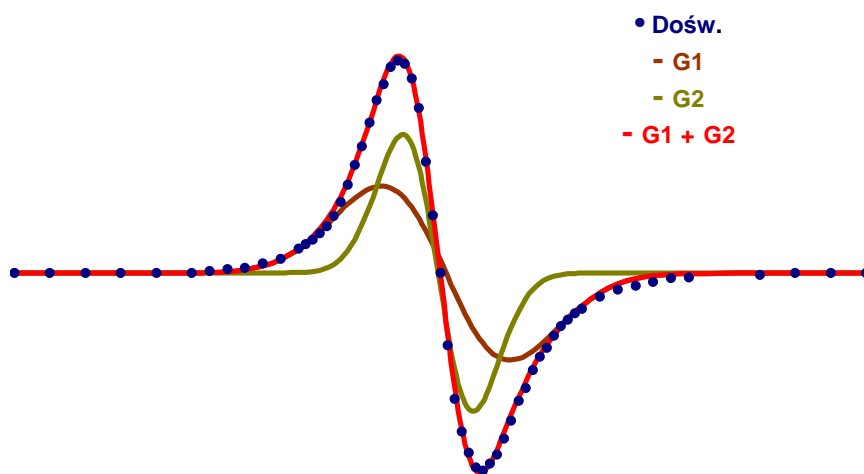


Rys. 27. Dopasowanie widma EPR DOPA-melaniny krzywą lorentzowską, $\chi^2 = 0,0677$

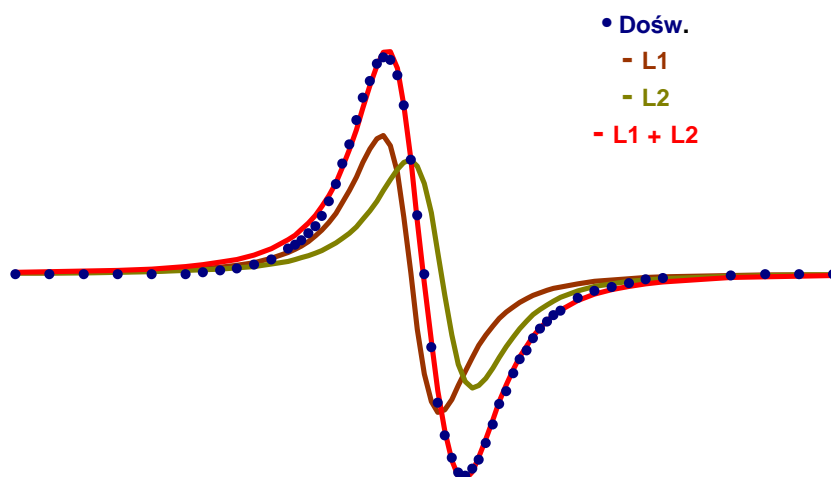
Otrzymane wyniki potwierdzają dane literaturowe, które mówią, że kształt linii EPR melaniny jest pośredni pomiędzy kształtem gaussowskim i lorentzowskim [130-131].

Na podstawie powyższych rezultatów wysunięto hipotezę, że linia EPR melaniny jest superpozycją dwóch linii składowych.

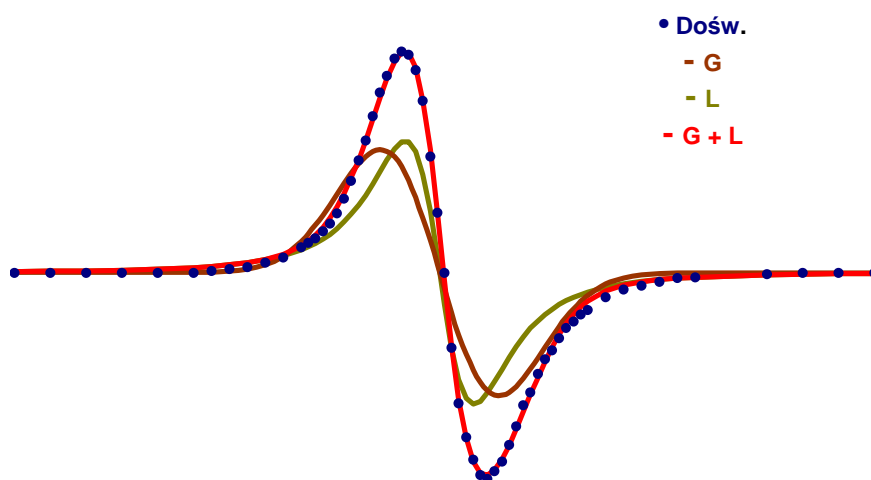
Rozważano model istnienia dwóch linii gaussowskich, dwóch linii lorentzowskich, oraz model będący kombinacją linii gaussowskiej i lorentzowskiej. Wyniki dopasowania przy użyciu wymienionych modeli przedstawione są na rysunkach 28-30.



Rys. 28. Dopasowanie widma EPR DOPA-melaniny superpozycją dwóch krzywych gaussowskich, $\chi^2 = 0,0119$.



Rys. 29. Dopasowanie widma EPR DOPA-melaniny superpozycją dwóch krzywych lorentzowskich, $\chi^2 = 0,0283$.



Rys. 30. Dopasowanie widma EPR DOPA-melaniny superpozycją krzywej gaussowskiej i lorentzowskiej, $\chi^2 = 0,0115$.

Najlepsze dopasowanie otrzymano w przypadku dwóch założonych modeli: w pierwszym przypadku, gdy założono superpozycję dwóch krzywych gaussowskich, a w drugim, gdy założono superpozycję krzywej gaussowskiej i lorentzowskiej (rys. 28, 30). W tych dwóch przypadkach

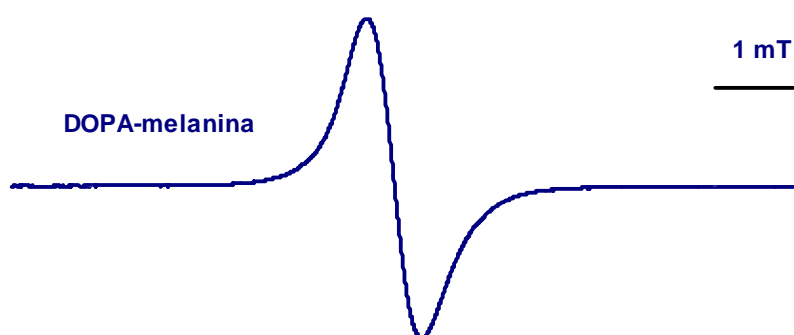
wartości współczynnika χ^2 są właściwie identyczne, co utrudnia rozstrzygnięcie problemu, który z proponowanych modeli jest poprawny. Powołując się jednak na literaturę [130-131], bardziej prawdziwy wydaje się być model będący superpozycją krzywej gaussowskiej i lorentzowskiej.

Zarejestrowana linia EPR DOPA-melaniny w warunkach nasycenia mikrofalowego może wskazywać na cechy dwuskładnikowości lub może sugerować również zjawisko anizotropii współczynnika rozszczepienia spektroskopowego g [130-131].

Biorąc pod uwagę wyniki otrzymane podczas badania kształtu linii EPR melaniny (przy założeniu dwuskładnikowości linii) oraz powołując się na dane z literatury naukowej [130-131], poruszony problem wieloskładnikowości widm EPR melaniny pozostaje bez rozstrzygnięcia.

4.1.2. Widma EPR kompleksów DOPA-melaniny z kanamycyną i jonami miedzi(II)

Widmo EPR DOPA-melaniny przedstawiono na rysunku 31. Widma EPR DOPA-melaniny i kompleksu DOPA-melanina-kanamycyna są podobne.



Rys. 31. Widma EPR DOPA-melaniny. Moc mikrofalowa wynosiła ok. 0,7 mW.

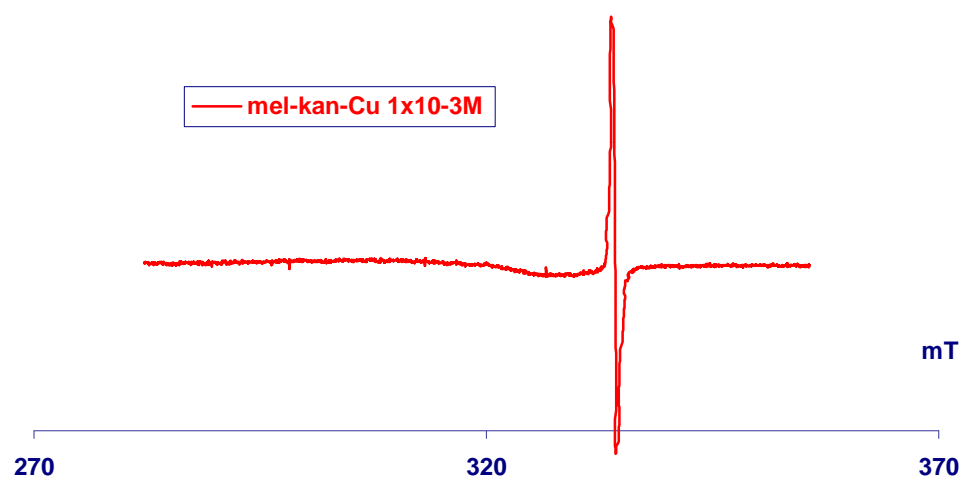
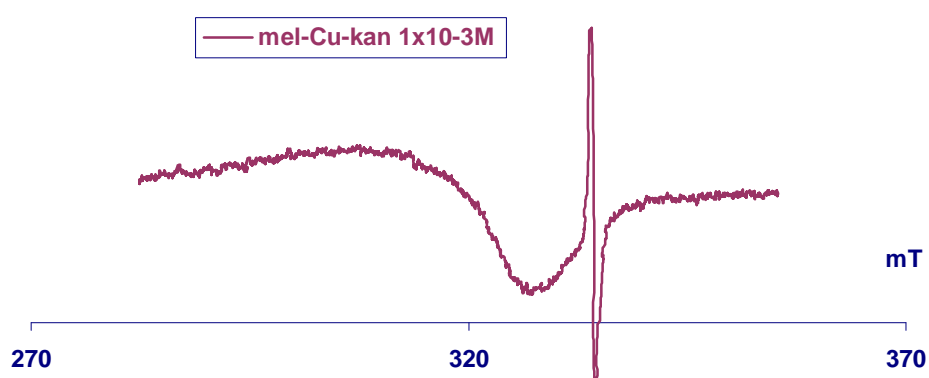
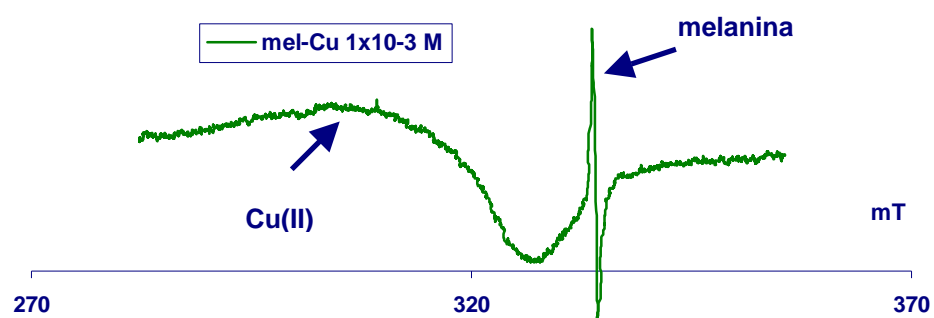
W widmach EPR kompleksów DOPA-melaniny z kanamycyną i jonami miedzi(II) obserwowano linie EPR wolnych rodników oraz

paramagnetycznych jonów Cu(II). Przykładowe widma EPR kompleksów DOPA-melaniny z kanamycyną i jonami miedzi(II) dla najwyższego stężenia jonów Cu 1×10^{-3} M przedstawiono na rysunku 32. Linie jonów Cu(II) nie występowały we wszystkich próbkach. Linii EPR jonów Cu(II) nie rejestrowano dla stężenia jonów metalu wynoszącego 1×10^{-5} M. Linii EPR jonów Cu(II) nie rejestrowano także w przypadku kompleksów mel+kan+Cu dla stężenia jonów miedzi wynoszącego 5×10^{-5} M.

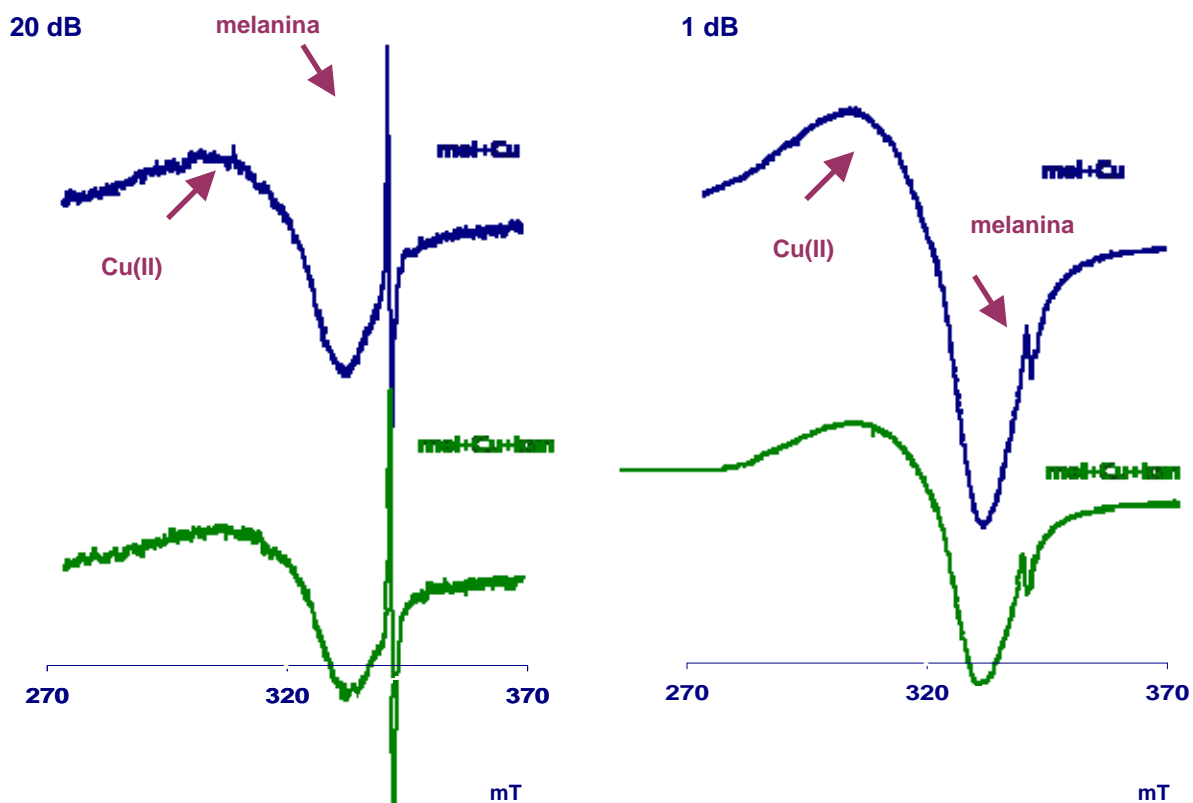
W widmach EPR kompleksów mel+kan+Cu linie EPR jonów miedzi(II) wykazywały znacznie niższe amplitudy, aniżeli linie EPR jonów miedzi(II) kompleksów mel+Cu i kompleksów mel+Cu+kan (rys. 32). Można stąd wnioskować, że lek w kompleksach mel+kan+Cu blokuje miejsca wiążące jonom miedzi(II). Stwierdzenie to potwierdzają wyniki analiz ilości jonów miedzi(II) związanych do polimeru melaninowego przedstawione w tabeli 2 (rozdział 3).

Rysunek 33 przedstawia wybrane widma EPR kompleksów DOPA-melaniny z jonami miedzi(II) i kanamycyną zarejestrowane przy tłumieniu 20 dB oraz 1 dB dla stężenia jonów miedzi 1×10^{-3} M. Dla wyższych mocy mikrofalowych obserwowany jest spadek sygnału EPR pochodzącego od rodników melaninowych (sygnał ulega nasyceniu). W przypadku sygnału EPR jonów Cu(II), widoczny jest jego wzrost ze wzrostem mocy mikrofalowej.

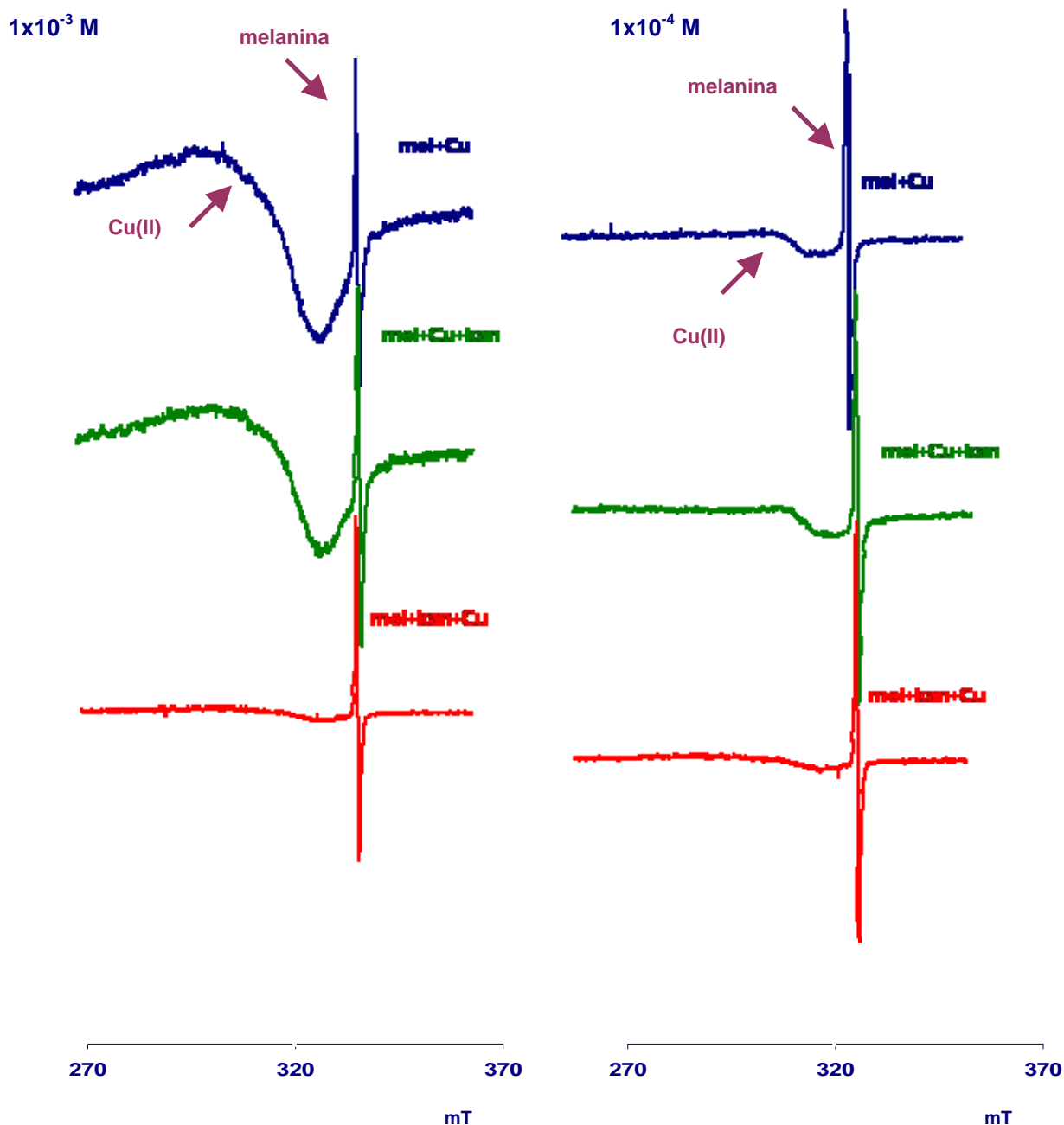
Rysunek 34 przedstawia widma kompleksów DOPA-melaniny z jonami miedzi(II) oraz kanamycyną przy stężeniu jonów metalu 1×10^{-3} oraz 1×10^{-4} M. Widma zarejestrowano przy tłumieniu 20 dB. W przypadku większego stężenia (1×10^{-3} M) dodawanych jonów metalu obserwowany jest znacznie większy ich sygnał EPR, aniżeli w przypadku mniejszego ich stężenia (1×10^{-4} M).



Rys. 32. Przykładowe widma EPR kompleksów DOPA-melaniny z jonami miedzi(II) i kanamycyną w przypadku różnej kolejności kompleksowania przy stężeniu jonów Cu(II) wynoszącym 1×10^{-3} M. Moc mikrofalowa wynosiła ok. 0,7 mW



Rys. 33. Widma EPR kompleksów DOPA-melaniny z jonami miedzi(II) i kanamycyną zarejestrowane przy tłumieniu 20 dB (na lewo) oraz 1 dB (na prawo) dla stężenia jonów miedzi 1×10^{-3} M.



Rys. 34. Widma kompleksów DOPA-melaniny z jonami miedzi(II) oraz kanamycyną przy stężeniu jonów metalu 1×10^{-3} (na lewo) oraz 1×10^{-4} M (na prawo). Widma zarejestrowano przy tłumieniu 20 dB.

4.1.3. Koncentracja wolnorodnikowych centrów paramagnetycznych w badanych próbkach oraz parametry ich widm EPR

Wyznaczono współczynnik rozszczepienia spektroskopowego g , szerokości linii EPR ΔB_{pp} oraz koncentrację wolnych rodników melaninowych N w badanych próbkach. W tym celu przeprowadzono pomiary EPR przy

niskiej mocy mikrofalowej, aby uniknąć zjawiska nasycenia mikrofalowego. Parametry widm EPR wolnych rodników melaninowych i koncentrację rodnikowych centrów paramagnetycznych pokazano w tabeli 3.

Tabela 3. Szerokość linii EPR ΔB_{pp} , współczynnik rozszczepienia spektroskopowego g , koncentracja wolnych rodników N w badanych kompleksach melaninowych w zależności od stężenia jonów miedzi(II) oraz względna koncentracja wolnych rodników względem próbki DOPA-melaniny. Stężenie kanamycyny wynosiło 1×10^{-3} M. Pomiar widm EPR wykonano w temperaturze pokojowej.

Próbka	Stężenie jonów Cu(II) [M]	ΔB_{pp} [± 0.02 mT]	g [± 0.0002]	N [10^{18} spin/g]	Koncentracja względna
DOPA-melanina	-	0,39	2,0045	13,2	-
(DOPA-melanina)-kanamycyna	-	0,39	2,0044	15,3	1,16
(DOPA-melanina)-Cu	1×10^{-5}	0,37	2,0044	12,9	0,98
	5×10^{-5}	0,39	2,0044	10,1	0,77
	1×10^{-4}	0,39	2,0043	8,0	0,61
	5×10^{-4}	0,41	2,0042	2,9	0,22
	1×10^{-3}	0,38	2,0044	2,3	0,17
[(DOPA-melanina-Cu)]-kanamycyna	1×10^{-5}	0,39	2,0044	14,1	1,07
	5×10^{-5}	0,43	2,0045	10,2	0,77
	1×10^{-4}	0,42	2,0045	8,1	0,61
	5×10^{-4}	0,36	2,0044	3,0	0,23
	1×10^{-3}	0,36	2,0044	2,6	0,20
[(DOPA-melanina-kanamycyna)]-Cu	1×10^{-5}	0,40	2,0045	14,3	1,08
	5×10^{-5}	0,37	2,0046	14,0	1,06
	1×10^{-4}	0,41	2,0047	10,4	0,79
	5×10^{-4}	0,39	2,0045	11,3	0,86
	1×10^{-3}	0,39	2,0045	10,4	0,79

Otrzymane szerokości linii EPR ΔB_{pp} badanych próbek są z zakresu 0,36–0,43 mT. Wartości te świadczą o występowaniu oddziaływań dipol-dipolowych, które są odpowiedzialne za poszerzenie linii EPR [119-122, 130]. Oddziaływania dipolowe niesparowanych elektronów znajdujących się w odległości r od siebie prowadzą do rozszerzenia zeemanowskich poziomów energetycznych o wielkość $h/\beta^2 r^3$, gdzie:

- h – stała Plancka,
- β – magneton Bohra,
- r – odległość między elektronami.

Nie zaobserwowano istotnego wpływu kolejności kompleksowania substancji oraz stężenia dodawanych jonów metalu na szerokości linii EPR ΔB_{pp} badanych próbek.

Wysoka wartość współczynnika rozszczepienia spektroskopowego g 2,0042–2,0047 wskazuje na lokalizację niesparowanego elektronu na atomie tlenu w polimerze melaninowym.

Współczynnik rozszczepienia spektroskopowego g zależy od stałej sprzężenia spin-orbita λ oraz od rozszczepienia orbitalnych poziomów energetycznych ΔE [132]. Wartości stałej sprzężenia spin-orbita λ dla atomu węgla, azotu, tlenu i siarki są przedstawione w tabeli 4.

Tabela 4. Wartości stałej sprzężenia spin-orbita λ dla atomu węgla, azotu, tlenu i siarki [132]

Atom	Stała sprzężenia spin-orbita λ [cm^{-1}]
węgiel C	-29
azot N	-76
tlenu O	-151
siarka S	-382

Tensor współczynnika rozszczepienia spektroskopowego g ma postać

[132]:

$$g_{ij} = g_e \left[\delta_{ij} - \frac{\lambda \sum_n (\langle \Psi_0 | L_i | \Psi_n \rangle \langle \Psi_n | L_j | \Psi_0 \rangle)}{E_n - E_0} \right] \quad (14)$$

gdzie:

$i, j = x, y, z$ – wskaźniki określające ortogonalne współrzędne tensora,

o – orbitalny poziom podstawowy,

n – orbitalny poziom wzbudzony,

δ_{ij} – delta Kroneckera, $\delta_{ij} = 1$ dla $i = j$, $\delta_{ij} = 0$ dla $i \neq j$,

g_e – współczynnik rozszczepienia spektroskopowego dla swobodnego elektronu,

Ψ – orbitalna funkcja falowa,

E – energia poziomu orbitalnego,

L – orbitalny moment pędu,

λ – stała sprzężenia spin-orbita

$$\lambda = \frac{g_e \beta^2}{e} \left(\frac{1}{r} \frac{dV}{dr} \right) \quad (15)$$

gdzie:

V – potencjał elektrostatyczny

r – odległość niesparowanego elektronu od jądra atomu.

Uproszczoną postać wzoru (14) można podać w następującej postaci [132]:

$$g = g_e \left(1 - \alpha \frac{\lambda}{\Delta E} \right) \quad (16)$$

gdzie:

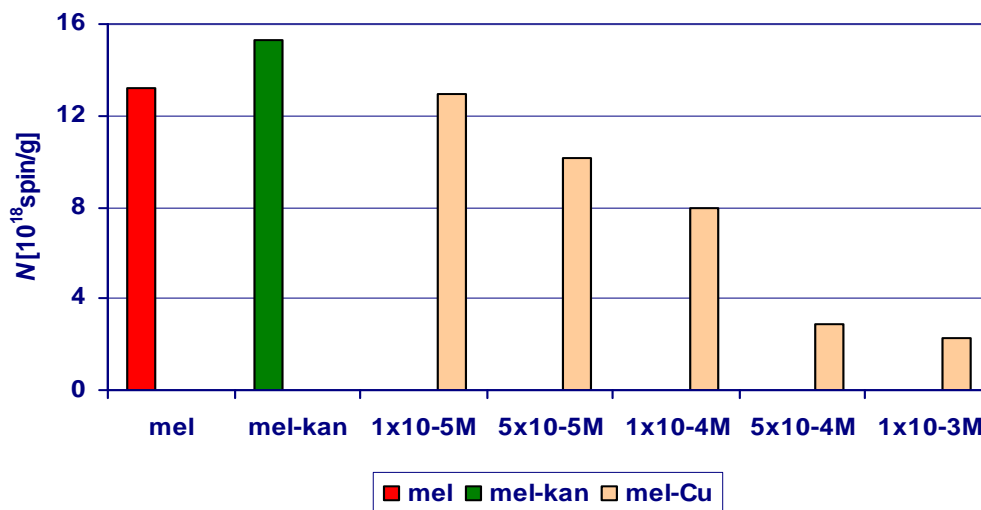
α - stała.

Koncentracja centrów paramagnetycznych w badanych kompleksach zależy od kolejności wprowadzania czynników kompleksujących oraz od stężenia dodawanych jonów miedzi(II) (Tabela 3). Kanamycyna powoduje wzrost koncentracji centrów paramagnetycznych, natomiast jony metalu paramagnetycznego powodują jej spadek. Najniższą koncentracją centrów paramagnetycznych charakteryzują się kompleksy melaniny z jonami miedzi(II), których stężenie w czasie syntezy próbek było największe (1×10^{-3}

M oraz 5×10^{-4} M). Dodanie leku jako drugiego składnika w kolejności, powoduje wzrost koncentracji centrów paramagnetycznych w porównaniu z kompleksami melaniny z samymi jonami metalu. Dodanie leku jako pierwszego składnika, a następnie wprowadzenie jonów miedzi(II), powoduje jeszcze większy wzrost koncentracji centrów paramagnetycznych. Ogólnie można napisać, że koncentracja centrów paramagnetycznych maleje w kolejności: melanina-lek > melanina > melanina-lek-metal > melanina-metal-lek > melanina-metal (Tabela 3).

Dodanie kanamycyny do melaniny spowodowało wzrost koncentracji rodników o 16 % (Tabela 3). W przypadku kompleksu mel+Cu+kan (1×10^{-5} M) oraz kompleksów mel+kan+Cu (1×10^{-5} i 5×10^{-5} M), zaobserwowano wzrost koncentracji rodników odpowiednio o 7, 8 i 6 %. Na podstawie uzyskanych wyników wnioskuje się, że pomimo użycia niskich stężeń jonów Cu(II), wprowadzone jony metalu związały się z polimerem poprzez struktury rodnikowe i w ten sposób wygasły rodnikowy sygnał EPR. Wniosek nasuwający się z poprzedniego stwierdzenia jest taki, że rodnikowe struktury w melaninie charakteryzują się większą siłą wiązania paramagnetycznych jonów metalu, aniżeli struktury wykazujące diamagnetyzm. Największy spadek koncentracji rodników wystąpił dla kompleksu mel+Cu oraz mel+Cu+kan (80 i 83%) w porównaniu do DOPA-melaniny. Są to dwa kompleksy, w których związała się największa i bardzo zbliżona ilość jonów Cu(II) (Tabela 2).

Dla lepszego pokazania różnic w koncentracjach *N* rodnikowych centrów paramagnetycznych w badanych kompleksach, oprócz zamieszczenia ich w tabeli 3, przedstawione je również na rysunkach 35-36. Wpływ kanamycyny i jonów Cu(II) na koncentrację wolnych rodników w DOPA-melaninie porównano na rysunku 35.

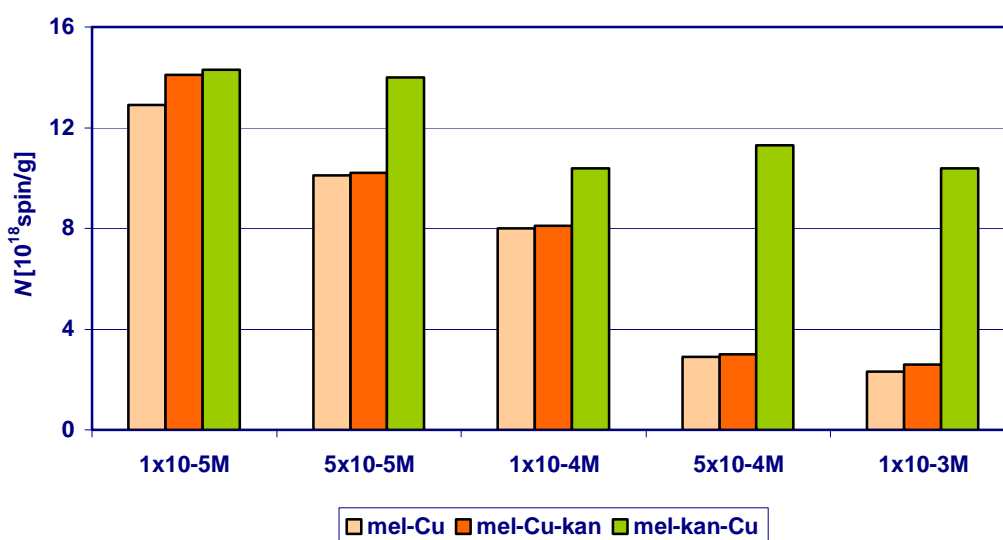


Rys. 35. Koncentracja wolnych rodników w DOPA-melaninie oraz w kompleksach DOPA-melaniny z kanamycyną i jonami Cu(II)

Kanamycyna podwyższa, a paramagnetyczne jony miedzi(II) obniżają koncentrację wolnych rodników w DOPA-melaninie (rys. 35, Tabela 3). Koncentracja wolnych rodników w DOPA-melaninie maleje wraz ze wzrostem stężenia jonów Cu(II). Podobną zależność obserwowano dla kompleksów neuromelanin z jonami miedzi(II) [83]. Znany jest też z literatury [2] pogląd o fizycznym mechanizmie oddziaływania melanina-Cu(II) odpowiedzialnym za spadek koncentracji wolnych rodników w kompleksach melaniny z paramagnetycznymi jonami metali (str. 77-78, niniejsza praca).

Generowanie wolnych rodników w melaninie przez kanamycynę stwierdzono w pracy [81]. Wzrost koncentracji wolnych rodników w DOPA-melaninie wskutek kompleksowania antybiotykami aminoglikozydowymi obserwowano także w przypadku gentamicyny, netilmicyny i dihydrostreptomycyny [51, 81, 133]. Generowanie wolnych rodników w melaninie przez antybiotyki aminoglikozydowe jest prawdopodobnie odpowiedzialne za efekty toksyczne towarzyszące działaniu tych leków na organizm ludzki. Biopolimer melaninowy wiąże lek wprowadzony do organizmu, a więc powoduje przedłużenie jego działania na tkanki. Wolne rodniki w kompleksach melanina-lek mogą inicjować niepożądane reakcje biochemiczne w organizmie człowieka. Za pomocą spektroskopii EPR i analiz biomedycznych stwierdzono, że antybiotyki aminoglikozydowe wywołujące silne efekty toksyczne generują duże ilości wolnych rodników w melaninie [17, 30, 50-51, 81, 133].

Wpływ kolejności kompleksowania DOPA-melaniny kanamycyną i jonami Cu(II) na koncentrację wolnych rodników w DOPA-melaninie przedstawiono na rysunku 36. Koncentracje wolnych rodników w kompleksach mel+Cu+kan i mel+kan+Cu porównano z koncentracją wolnych rodników w kompleksach mel+Cu. Koncentracje wolnych rodników w kompleksach mel+Cu+kan są niewiele wyższe od koncentracji dla kompleksów mel+Cu (rys. 36, Tabela 3). Jony Cu(II) blokują prawdopodobnie miejsca wiążące dla kanamycyny, która podwyższa koncentrację wolnych rodników w melaninie. Ilość miedzi(II) związanej w kompleksie mel+Cu+kan jest nieznacznie niższa od ilości miedzi(II) związanej w kompleksie mel+Cu (Tabela 2).



Rys. 36. Koncentracja wolnych rodników w kompleksach DOPA-melaniny z jonami Cu(II) i kanamycyną w zależności od kolejności kompleksowania przy stężeniu jonów Cu(II) wynoszącym od 1×10^{-5} do 1×10^{-3} M

Koncentracje wolnych rodników w kompleksach mel+kan+Cu są wyższe niż w kompleksach mel+Cu+kan (rys. 36, Tabela 3). Kanamycyna w kompleksach mel+kan+Cu blokuje prawdopodobnie miejsca wiążące jonom Cu(II), które obniżają koncentracje wolnych rodników w melaninie. Ilość miedzi związanej z melaniną w kompleksach mel+kan+Cu jest niższa w porównaniu z ich ilością w przypadku kompleksów mel+Cu+kan (Tabela 2).

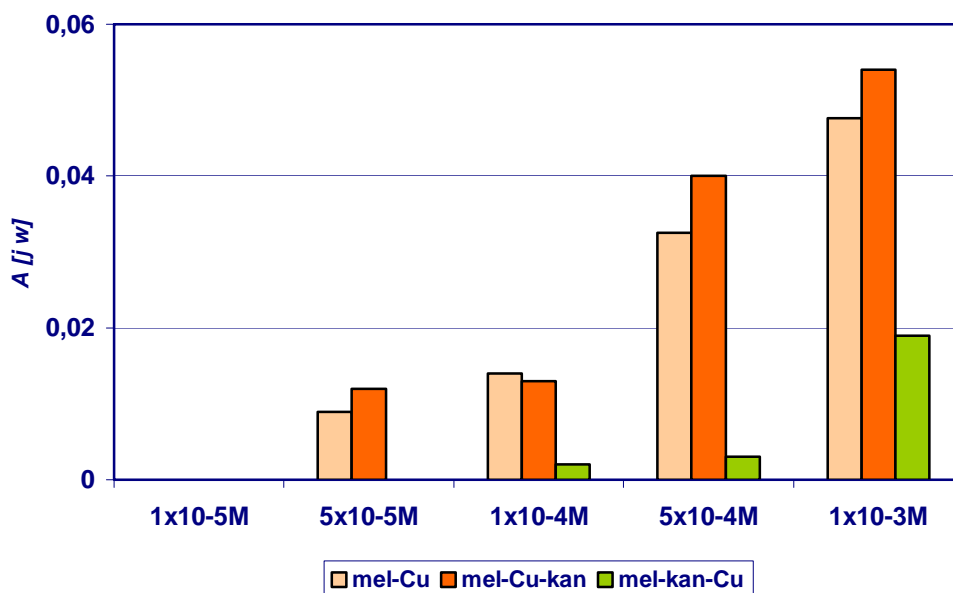
4.2. Widma EPR jonów miedzi(II) w badanych kompleksach

4.2.1. Ogólna charakterystyka widm EPR jonów miedzi(II)

W badanych kompleksach zarejestrowano bardzo szerokie widma EPR jonów miedzi(II) o szerokości linii powyżej 7 mT. Wartość amplitudy zmienia się w zależności od stężenia dodanych jonów metalu oraz zależy od kolejności ich kompleksowania do melaniny.

Amplitudy sygnału EPR paramagnetycznych jonów miedzi(II) zestawiono na rysunku 37.

Linii EPR jonów Cu(II) nie rejestrowano dla najniższego stężenia jonów miedzi(II) we wszystkich badanych kompleksach (rys. 37).



Rys. 37. Amplitudy linii EPR paramagnetycznych jonów Cu(II) kompleksów DOPA - melaniny z kanamycyną i jonami Cu(II)

Amplituda linii EPR jonów Cu(II) w kompleksach mel+Cu rośnie wraz ze wzrostem stężenia dla stężeń z badanego zakresu 5×10^{-5} – 1×10^{-3} M (rys. 37). Ilość jonów miedzi(II) związanych do DOPA-melaniny w kompleksach mel+Cu rośnie wraz ze wzrostem stężenia w całym zakresie stosowanych stężeń (1×10^{-5} – 1×10^{-3} M) (Tabela 2, rozdział 3).

Amplituda linii EPR paramagnetycznych jonów Cu(II) w kompleksach mel+Cu+kan oraz mel+kan+Cu również rośnie wraz ze wzrostem stężenia

(5×10^{-5} – 1×10^{-3} M) (rys. 37). Efekt ten jest zgodny z oczekiwaniami, ponieważ ilość jonów miedzi(II) związanych do melaniny w wyżej wymienionych kompleksach wzrasta wraz ze wzrostem stężenia dodawanych jonów metalu (Tabela 2, rozdział 3).

Amplitudy linii EPR jonów Cu(II) w kompleksach mel+kan+Cu są mniejsze niż amplitudy linii jonów Cu(II) w kompleksach mel+Cu+kan (rys. 37). Zależność ta spowodowana jest mniejszą ilością jonów Cu(II) związanych do melaniny w kompleksach mel+kan+Cu (Tabela 2, rozdział 3). Kanamycyna w kompleksach mel+kan+Cu blokuje miejsca wiążące jonom miedzi(II).

Określenie bezwzględnej liczby miedziowych centrów paramagnetycznych jest utrudnione ze względu na charakter ich widm EPR. Dlatego w celu zobrazowania tego zagadnienia, przedstawiono amplitudy sygnałów EPR jonów miedzi(II) i rodników melaninowych (Tabela 5). Dane z tabeli 5 pokazują, że amplituda sygnału EPR jonów miedzi(II) zarejestrowanego przy 20 dB, rośnie ze wzrostem stężenia dodawanych jonów metalu i zależy od kolejności wprowadzania czynników kompleksujących do melaniny. Ze wzrostem sygnału EPR jonów miedzi, maleje sygnał EPR pochodzący od rodników melaninowych.

Tabela 5. Amplitudy sygnałów EPR jonów Cu(II) oraz rodników melaninowych w badanych próbkach zarejestrowanych przy tłumieniu 20 dB w temperaturze pokojowej. Stężenie jonów Cu(II) wynosiło 1×10^{-5} - 1×10^{-3} M

PRÓBKA	Stężenie jonów Cu(II) [M]	A x 10 [j w]	
		Cu(II)	Melanina
(DOPA-melanina)-Cu	5×10^{-5}	0,009	0,77
	1×10^{-4}	0,014	0,49
	5×10^{-4}	0,033	0,13
	1×10^{-3}	0,048	0,16
[(DOPA-melanina-Cu)]-kanamycyna	5×10^{-5}	0,012	0,55
	1×10^{-4}	0,013	0,29
	5×10^{-4}	0,040	0,26
	1×10^{-3}	0,054	0,23
[(DOPA-melanina-kanamycyna)]-Cu	1×10^{-4}	0,002	1,12
	5×10^{-4}	0,003	0,70
	1×10^{-3}	0,019	0,84

4.2.2. Otoczenie koordynacyjne jonów miedzi(II) w melaninie

Niektóre uzyskane widma EPR przysparzają wielu trudności w ich interpretacji [134]. Zarejestrowane widma EPR jonów Cu(II) w badanych w pracy [135] kompleksach nie wykazywały struktury nadsubtelnej, przez co ich interpretacja była znacznie utrudniona. W niniejszej pracy otrzymano widma o takim właśnie charakterze (rys. 32-34).

Można jednak wyznaczyć przybliżony współczynnik rozszczepienia spektroskopowego $g_{\perp} = 2,05$ oraz $g_{\parallel} = 2,20$. Wartości te pozwalają określić

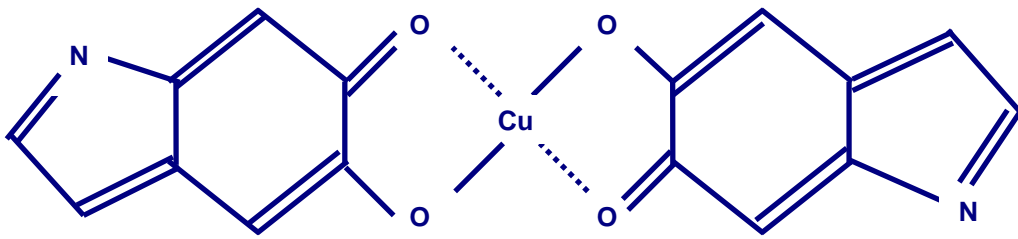
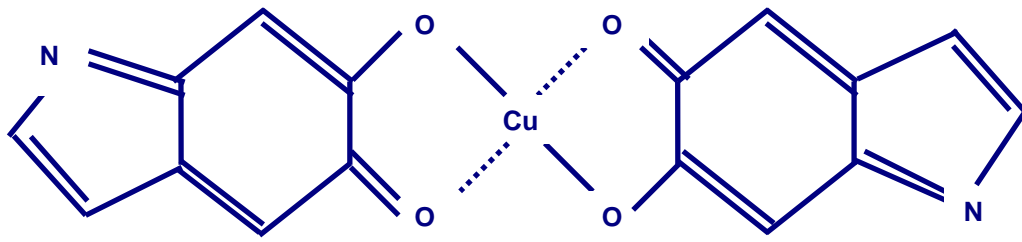
wartość G [136], która jest wskaźnikiem wielkości oddziaływania wymiennego, zdefiniowaną jako

$$G = \frac{g_{\parallel} - 2}{g_{\perp} - 2}.$$

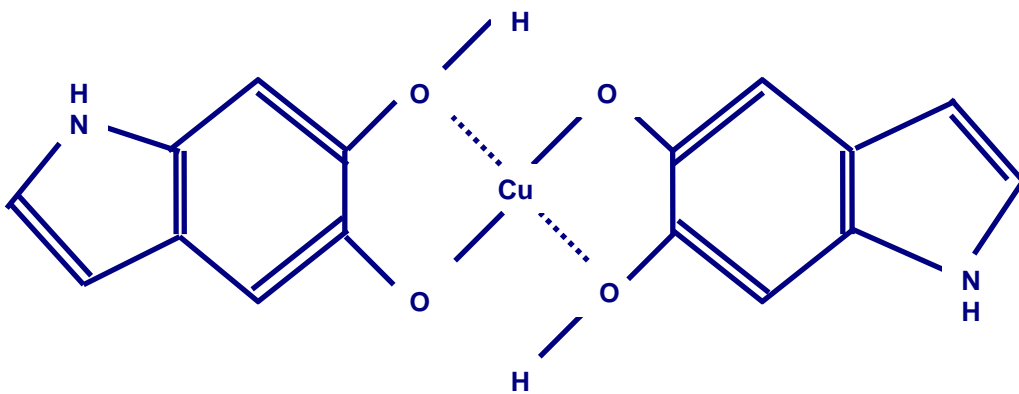
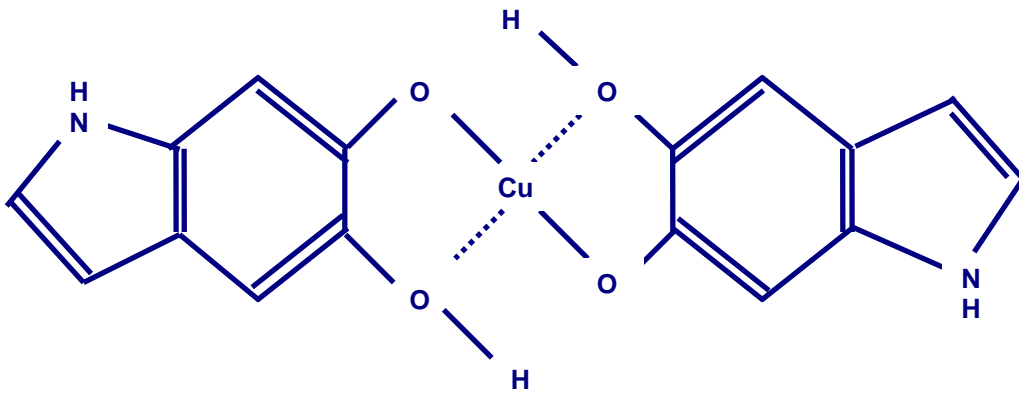
Gdy $G = 4,0 - 4,5$, to sprzężenie wymienne między jonami miedzi(II) jest do zaniedbania. W rozważanym w niniejszej pracy przypadku wielkość $G = 4,0$.

Otrzymane wartości obu współczynników rozszczepienia spektroskopowego g pozwalają na określenie symetrii jonu miedzi(II) w badanej próbce [136]. Gdy stanem podstawowym jest $|x^2 - y^2\rangle$, wówczas spełniona jest nierówność $g_{\parallel} > g_{\perp} > 2$. Dla wspomnianego stanu podstawowego charakterystyczna jest symetria kompleksu wydłużonego oktaedru, kwadratu lub piramidy kwadratowej. Na rysunku 38 przedstawiono propozycje otoczenia jonu Cu(II) w melanine. Znane są z literatury propozycje otoczenia jonów Cu(II) przez cztery ligandy, wśród których znajdują się cząsteczki wody (rys. 5) [53]. W niniejszej pracy użyto suchych próbek melaninowych i dlatego zaproponowano otoczenia jonu Cu(II) bez cząsteczek H₂O.

a)



b)



Rys. 38. Propozycja otoczenia kwadratowego jonu Cu(II) w melaninie

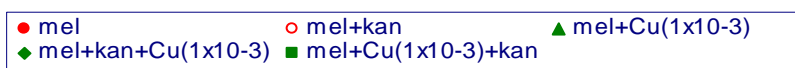
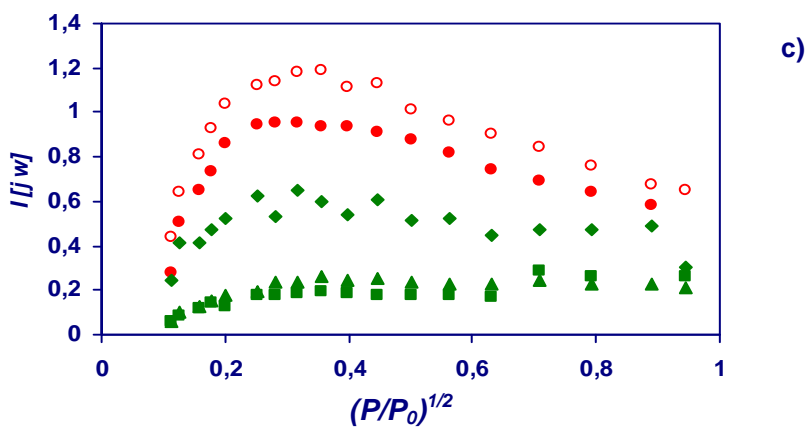
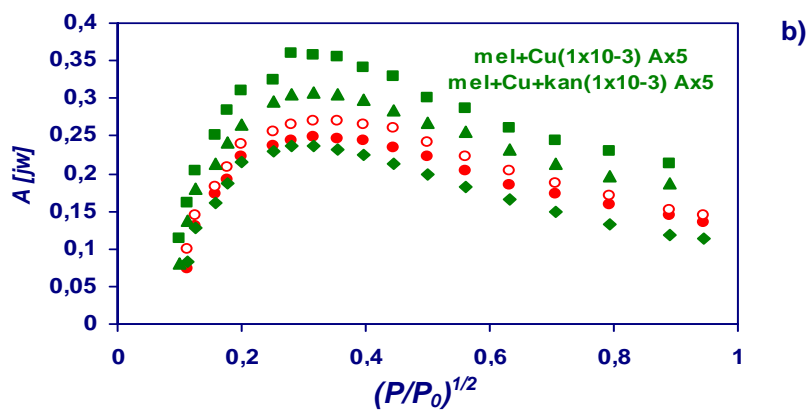
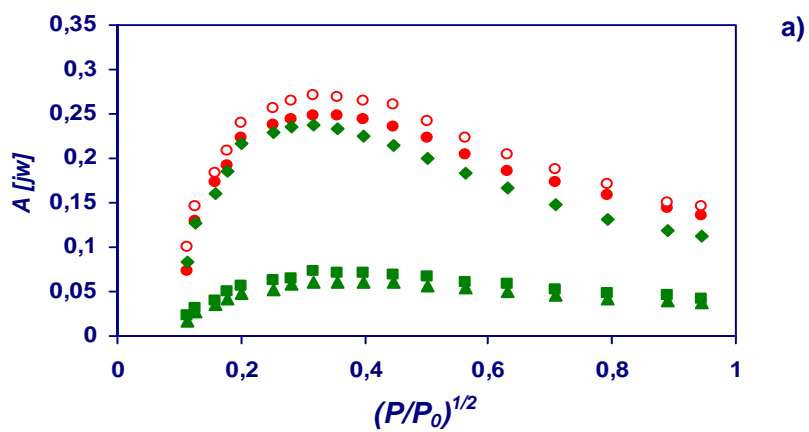
4.3. Nasycenie mikrofalowe widm EPR badanych próbek

4.3.1. Wpływ mocy mikrofalowej na wolnorodnikowy sygnał EPR melaniny

Przeprowadzono badania wpływu mocy mikrofalowej na parametry widm EPR (amplituda A , intensywność I , szerokość linii ΔB_{pp}) próbek melaniny oraz jej kompleksów z kanamycyną i jonami miedzi(II). Na przedstawionych w tym rozdziale wykresach zastosowano skrócone nazwy badanych próbek (Tabela 1, rozdział 3). Stężenia dodanych jonów miedzi(II) zostały podane w nawiasie przy nazwie próbki w legendzie rysunku.

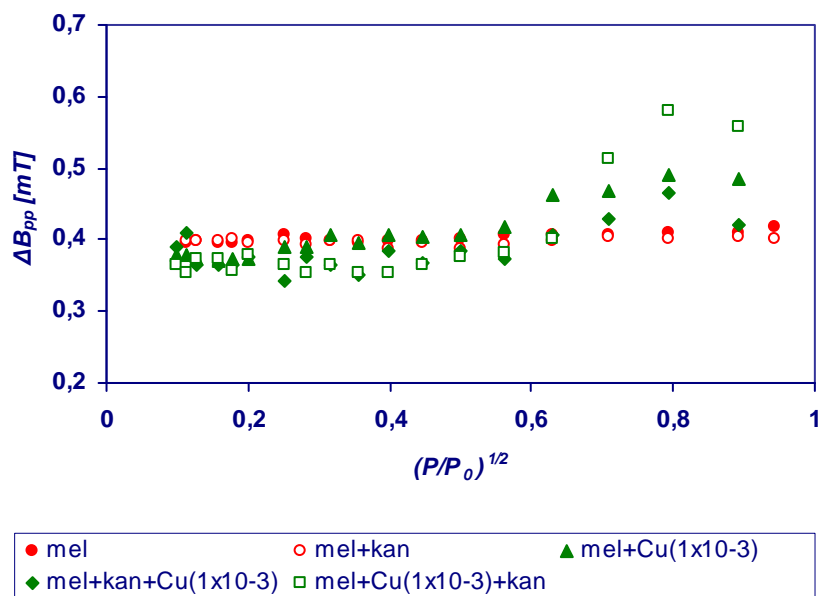
Na rysunku 39 przedstawiono wpływ mocy mikrofalowej na amplitudę A i intensywność I sygnału EPR melaniny oraz jej kompleksów z kanamycyną i jonami miedzi(II) przy stężeniu jonów miedzi(II) równym 1×10^{-3} M oraz przy różnej kolejności kompleksowania. Zaobserwowano wzrost amplitudy i intensywności sygnału EPR po dodaniu kanamycyny do melaniny (rys. 39). Lek indukuje wolne rodniki melaninowe wpływające na zmianę mierzonych parametrów widma EPR [50-51, 81, 133]. Analizie poddano próbki, do których jako pierwszy dodano lek, a potem jony miedzi(II), w drugim przypadku postąpiono odwrotnie. Czynniki kompleksujące, który jest dodany do polimeru melaninowego jako pierwszy, blokuje miejsca wiążące dla drugiej substancji dodanej do próbki. Na rysunku 39 dobrze obrazują to próbki oznaczone jako mel+kan+Cu(1×10^{-3}) oraz mel+Cu(1×10^{-3})+kan.

Wszystkie zarejestrowane linie EPR (rys. 39) nasycają się ze wzrostem mocy mikrofalowej stosowanej podczas pomiarów. Oznacza to, że badane próbki melaniny charakteryzują długie czasy relaksacji spin-sieć T_1 . Dodanie jonów miedzi(II) ((DOPA-melanina)-Cu(II), [(DOPA-melanina)-Cu(II)]-kanamycyna) powoduje niewielkie przesunięcie efektu nasycenia mikrofalowego ku wyższym mocom mikrofalowym, a zarazem skrócenie czasu relaksacji spin-sieć T_1 (rys. 39). Uzyskane wyniki są zgodne z danymi literaturowymi [50-51, 82-83].



Rys. 39. Wpływ mocy mikrofalowej na amplitudę (a, b) A i intensywność (c) linii EPR DOPA-melaniny i jej kompleksów z jonami miedzi(II) i kanamycyną. Amplitudy kompleksu mel+Cu oraz mel+Cu+kan zostały pomnożone przez 5 na rysunku (b). Stężenie jonów Cu(II) wynosiło 1×10^{-3} M.

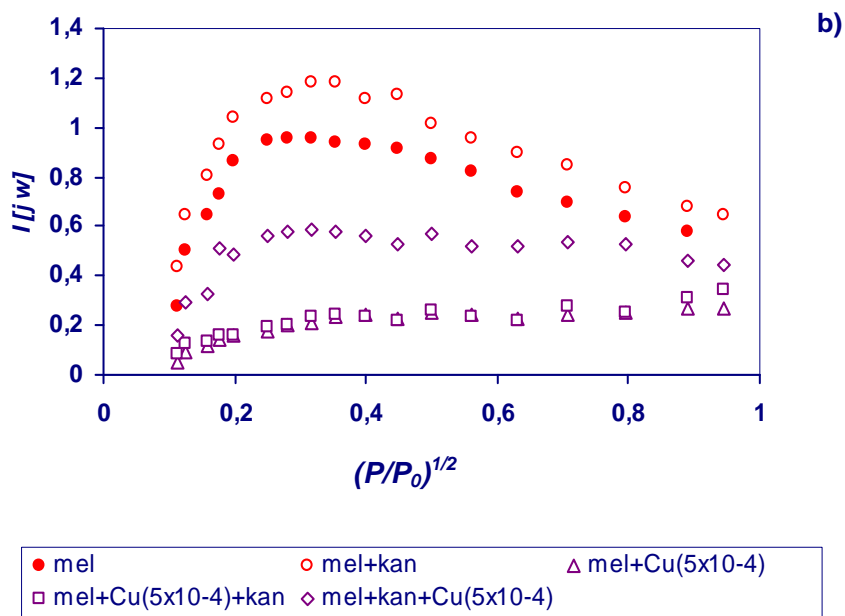
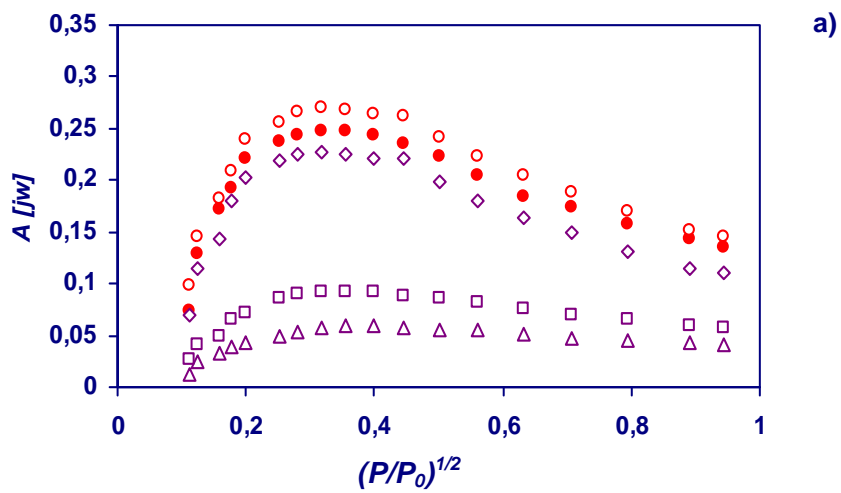
Dla wszystkich badanych próbek analizowano również wpływ mocy mikrofalowej na szerokość linii EPR ΔB_{pp} . Wpływ mocy mikrofalowej na szerokość linii EPR ΔB_{pp} próbek omówionych powyżej przedstawia rysunek 40.



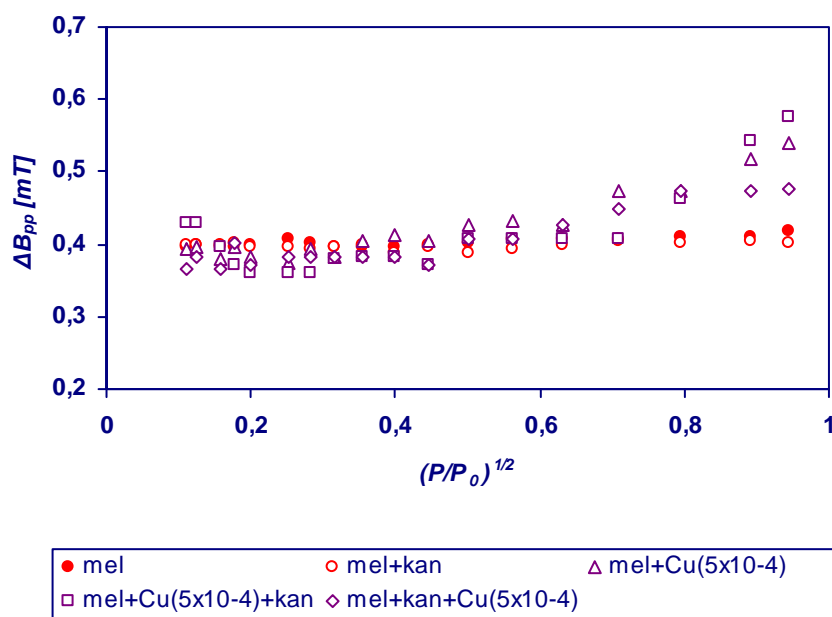
Rys. 40. Wpływ mocy mikrofalowej na szerokość linii EPR ΔB_{pp} DOPA-melaniny i jej kompleksów z jonami miedzi(II) i kanamycyną. Stężenie jonów Cu(II) wynosiło 1×10^{-3} M.

W przypadku próbek mel oraz mel+kan stwierdzono jedynie niewielki wpływ mocy mikrofalowej na szerokości linii ΔB_{pp} (rys. 40). Znaczny wzrost szerokości linii ΔB_{pp} wraz ze wzrostem mocy mikrofalowej zaobserwowano dla próbek melaninowych, które zawierały jony miedzi(II) (rys. 40).

Podobne zależności jak na rysunkach 39 oraz 40, przedstawiono na rysunkach 41 i 42 dla takiego samego zestawienia próbek (tzn. taka sama kolejność kompleksowania), ale przy stężeniu 5×10^{-4} M dodanych jonów Cu(II). Efekty spowodowane w przypadku tych próbek są takie same, jak omówiono powyżej. Zjawisko nasycenia obrazują lepiej zależności amplitudy widma EPR od mocy mikrofalowej w porównaniu z zależnościami intensywności widma EPR. Związane jest to z błędem wyznaczenia intensywności widm EPR, co z kolei wiąże się z błędem przy odczycie szerokości widm EPR.



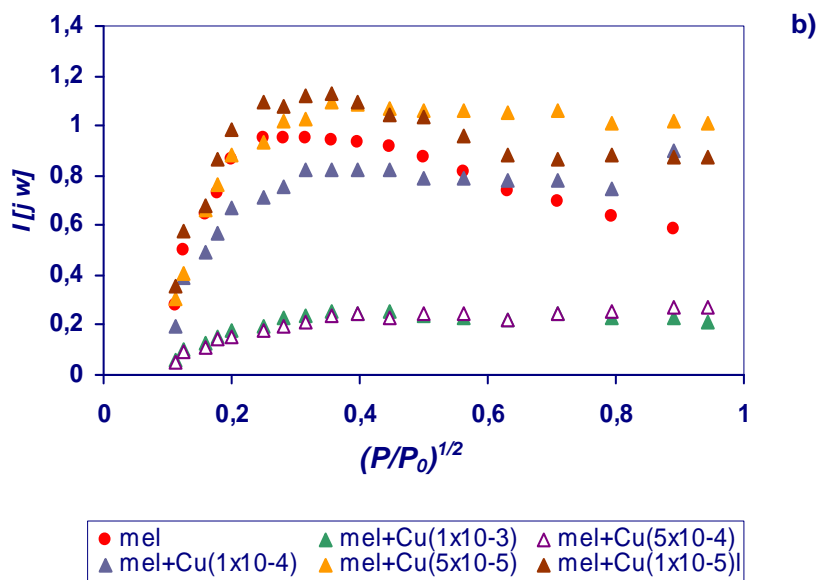
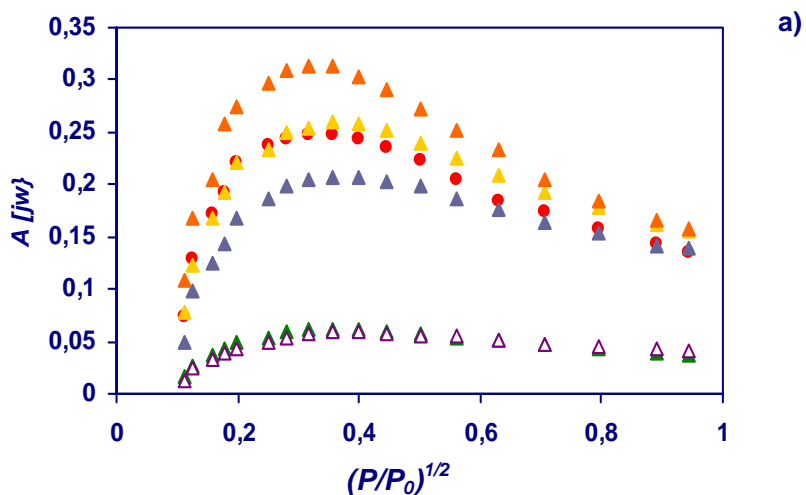
Rys. 41. Wpływ mocy mikrofalowej na amplitudę A (a) i intensywność I (b) linii EPR DOPA-melaniny i jej kompleksów z kanamycyną i jonami miedzi(II). Stężenie jonów Cu(II) wynosiło 5×10^{-4} M.



Rys. 42. Wpływ mocy mikrofalowej na szerokość linii EPR ΔB_{pp} DOPA-melaniny i jej kompleksów z jonami miedzi(II) i kanamycyną. Stężenie jonów Cu(II) wynosiło 5×10^{-4} M.

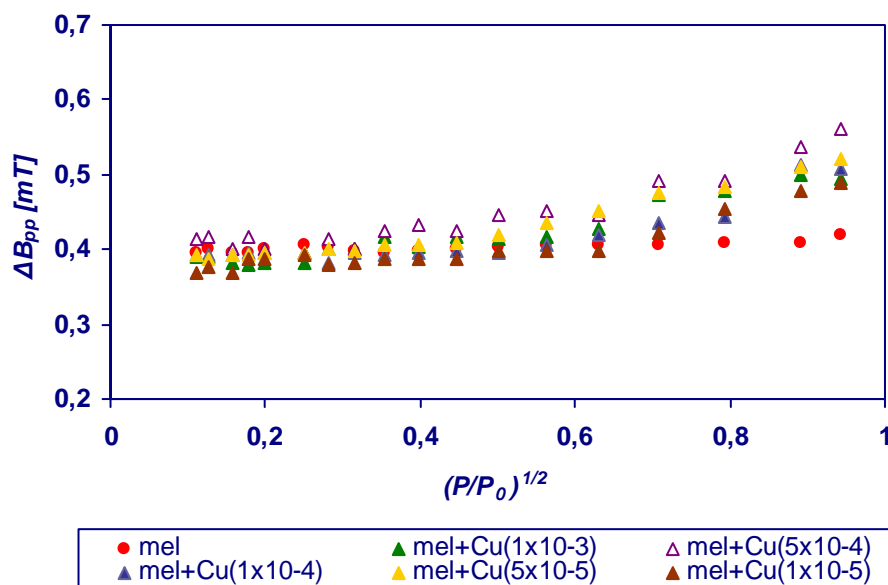
Sporządzono również inne zestawienia wyników badań wpływu mocy mikrofalowej na parametry zarejestrowanych widm EPR. Na rysunku 43 przedstawiono intensywności linii EPR w zależności od mocy mikrofalowej dla kompleksów melaniny z jonami miedzi(II) zawierającymi różne stężenia jonu metalu. Na rysunku 43 widoczna jest również zależność intensywności linii EPR od mocy mikrofalowej dla DOPA-melaniny, która pełni tutaj rolę wzorca. Wysokie stężenia dodanych jonów metalu (1×10^{-3} M, 5×10^{-4} M) powodują znaczne obniżenie amplitudy A i intensywności I widma EPR (rys. 43). Dla próbek o niskim stężeniu jonów metalu (1×10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 1×10^{-5} M), skrócenie czasu relaksacji spin-sieć T_1 jest wyraźniejsze niż dla próbek o największych stężeniach jonów miedzi(II) (1×10^{-3} M, 5×10^{-4} M (rys. 43). Istotne jest to, że wydłużenie czasu T_1 sugerowane w pracy [2] nie występuje we wszystkich badanych próbkach zawierających paramagnetyczne jony Cu(II) niezależnie od kolejności dodawania czynników kompleksujących do melaniny i od ich stężenia. Według Sarny [2] „gaszenie” sygnału EPR wolnych rodników melaniny jest spowodowane wydłużeniem czasu relaksacji spin-sieć w polimerze zawierającym paramagnetyczne jony metalu. Przeprowadzone w niniejszej pracy badania wpływu mocy mikrofalowej na

amplitudy linii EPR wolnych rodników DOPA-melaniny oraz jej kompleksów z kanamycyną i jonami Cu(II) nie potwierdziły tego poglądu. Stwierdzono niewielkie skrócenie czasu relaksacji spin-sieć w próbkach DOPA-melaniny oraz w jej kompleksach z kanamycyną po dodaniu paramagnetycznych jonów miedzi(II). Biorąc pod uwagę analizy koncentracji wolnych rodników w kompleksach DOPA-melaniny z kanamycyną i jonami Cu(II) oraz analizy nasycenia mikrofalowego ich linii EPR można stwierdzić, że obniżenie koncentracji wolnych rodników w DOPA-melaninie spowodowane obecnością jonów miedzi(II), wskazuje na możliwość udziału wolnych rodników w wiązaniu metalu do polimeru.



Rys. 43. Wpływ mocy mikrofalowej na amplitudę A (a) i intensywność I (b) linii EPR DOPA-melaniny i jej kompleksów z jonami miedzi(II). Stężenie jonów Cu(II) : 1×10^{-5} - 1×10^{-3} M.

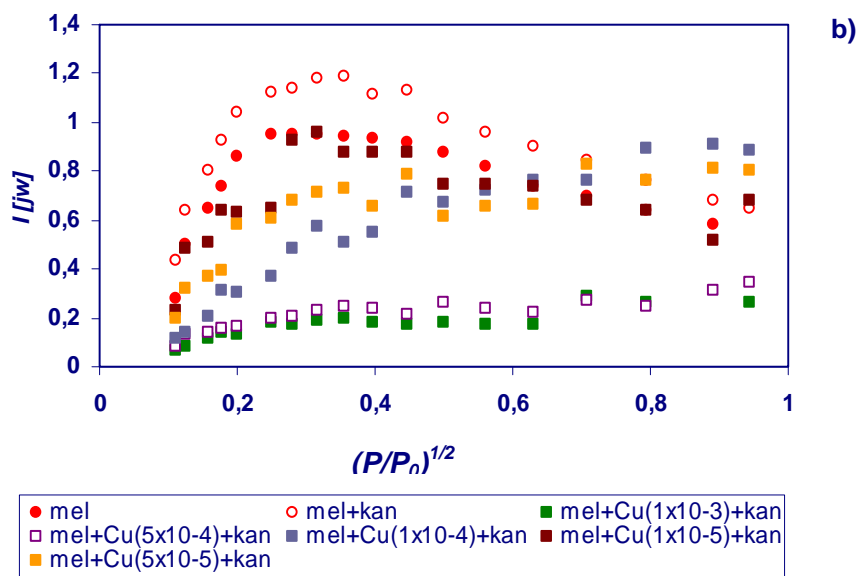
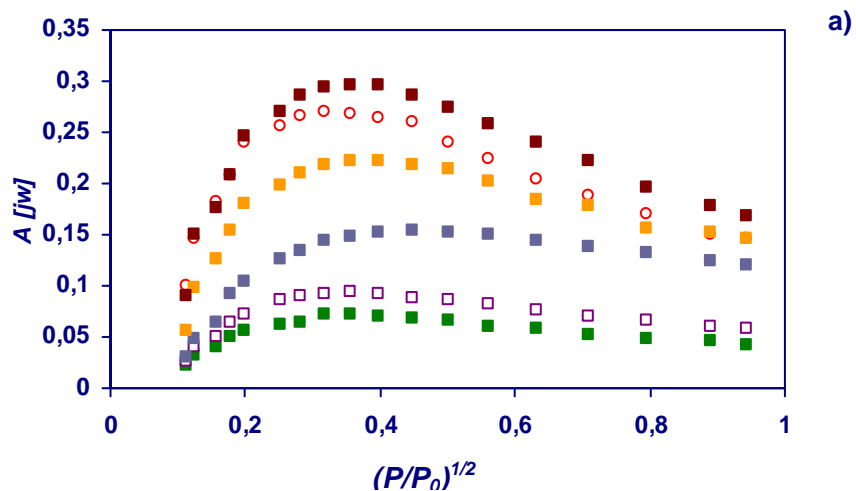
Na rysunku 44 pokazano wpływ mocy mikrofalowej na szerokość linii dla zestawu próbek z rysunku 43. Widoczna jest wyraźna tendencja wzrostowa szerokości linii EPR próbek zawierających jony miedzi(II) przy jednoczesnym wzroście mocy mikrofalowej.



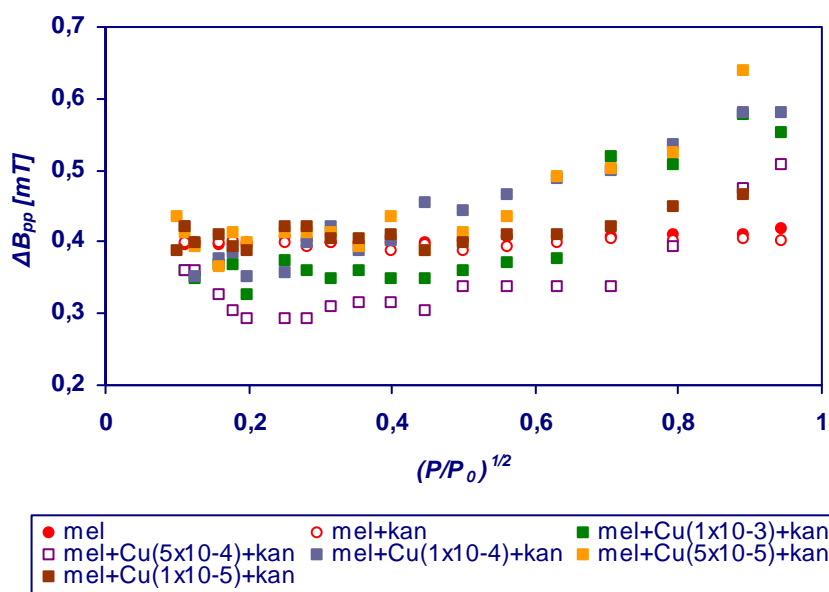
Rys. 44. Wpływ mocy mikrofalowej na szerokość linii EPR ΔB_{pp} DOPA-melaniny i jej kompleksów z jonami miedzi(II). Stężenie jonów Cu(II) wynosiło 1×10^{-5} - 1×10^{-3} M.

Na rysunku 45 przedstawiono zależności amplitudy A i intensywności I widm EPR od mocy mikrofalowej próbek mel+Cu+kan, a na rysunku 47 próbek mel+kan+Cu przy wszystkich użytych stężeniach jonów miedzi(II). Jako wzorzec na tych rysunkach umieszczono próbkę mel+kan, względem, której porównywano zmiany amplitudy i intensywności sygnału EPR pozostałych próbek.

Obserwując wpływ mocy mikrofalowej na szerokości linii EPR kompleksów mel+Cu+kan przy wszystkich użytych stężeniach jonów metalu (1×10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 1×10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 1×10^{-5} M) (rys. 46), widzimy, tak jak poprzednio (rys. 40, 42, 44), tendencję wzrostową wraz ze wzrostem mocy mikrofalowej stosowanej w trakcie pomiaru w przypadku próbek zawierających jony miedzi(II).



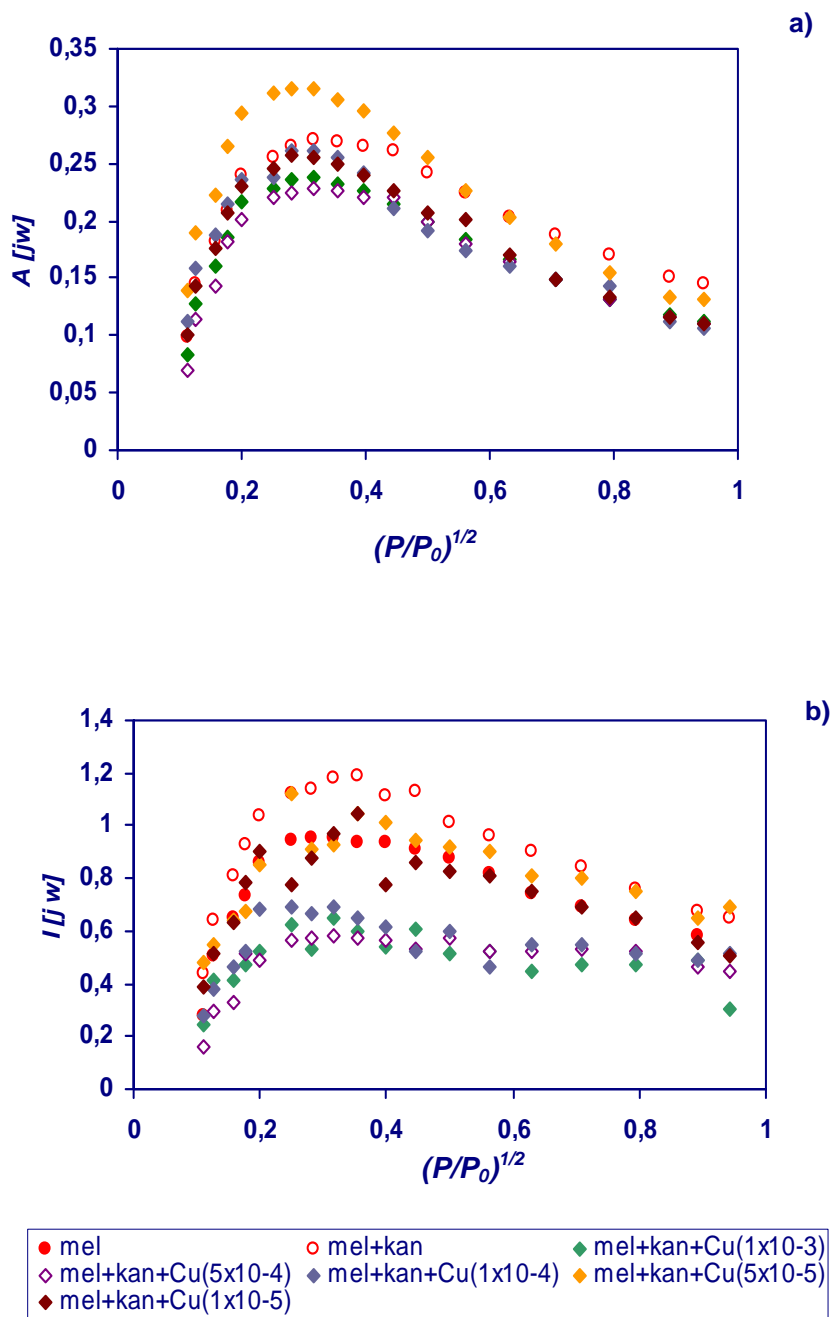
Rys. 45. Wpływ mocy mikrofalowej na amplitudę A (a) i intensywność I (b) linii EPR DOPA-melaniny i jej kompleksów z jonami miedzi(II) i kanamycyną. Stężenia jonów Cu(II) wynosiły 1×10^{-5} - 1×10^{-3} M.



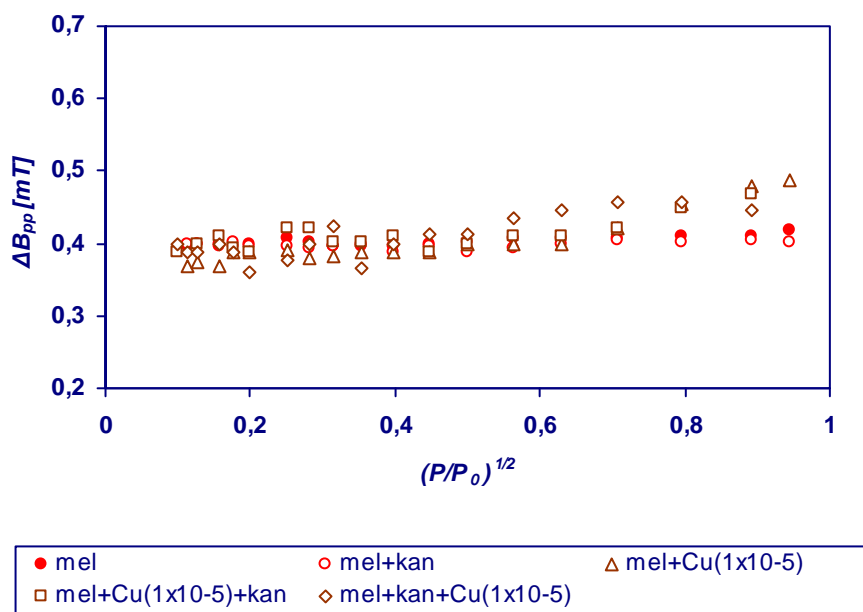
Rys. 46. Wpływ mocy mikrofalowej na szerokość linii EPR ΔB_{pp} DOPA-melaniny i jej kompleksów z jonami miedzi(II) i kanamycyną. Stężenia jonów Cu(II) wynosiły $1 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-3} M$.

Na rysunkach 45 i 47, tak samo jak dla wspomnianych powyżej próbek, widoczny jest spadek amplitudy A i intensywności I linii EPR badanych kompleksów ze wzrostem stężenia dodanych jonów metalu. Widać, więc że efekt zmniejszenia amplitudy (intensywności) sygnału rodnikowego melaniny dla wyższych mocy mikrofalowych oraz wzrost szerokości linii tego sygnału ze wzrostem mocy mikrofalowej, ma miejsce w całym zakresie użytych stężeń jonów miedzi(II).

Rysunek 48 zawierający kolejny zestaw szerokości sygnału EPR względem mocy mikrofalowej, pokazuje ten sam efekt (wzrost szerokości linii ze wzrostem mocy mikrofalowej), który jest charakterystyczny dla wszystkich linii EPR przedstawionych w tym rozdziale.



Rys. 47. Wpływ mocy mikrofalowej na amplitudę A (a) i intensywność I (b) linii EPR DOPA-melaniny i jej kompleksów z kanamycyną i jonami miedzi(II). Stężenia jonów Cu(II) wynosiły 1×10^{-5} - 1×10^{-3} M.



Rys. 48. Wpływ mocy mikrofalowej na szerokość linii EPR ΔB_{pp} DOPA-melaniny i jej kompleksów z jonami miedzi(II) i kanamycyną. Stężenie jonów Cu(II) wynosiło $1 \times 10^{-5} M$

Uzyskane wyniki przeprowadzone metodą ciągłego nasycenia mikrofalowego linii EPR pokazały, że zarejestrowane sygnały EPR pochodzące od rodnikowych centrów paramagnetycznych w badanych próbkach melanin są liniami poszerzonymi jednorodnie (amplitudy sygnału EPR nasycają się dla wyższych mocy mikrofalowych, a ich szerokości wzrastają ze wzrostem mocy mikrofalowej). Efekty te są niezależne od użytego stężenia jonów paramagnetycznych wprowadzonych do melaniny.

Na zakończenie tego rozdziału warto podkreślić raz jeszcze fakt, że przeprowadzone w niniejszej pracy badania i analizy koncentracji rodnikowych centrów paramagnetycznych oraz wpływ mocy mikrofalowej na rodnikowy sygnał EPR badanych próbek melaninowych z kanamycyną i jonami miedzi(II) nie potwierdzają poglądu przedstawionego w publikacji [2] stwierdzającego, że wydłużenie czasu relaksacji spin-sieć T_1 powoduje „gaszenie” rodnikowego sygnału EPR polimeru melaninowego zawierającego paramagnetyczne jony metalu. W niniejszej pracy nie zaobserwowałam wydłużenia czasu T_1 .

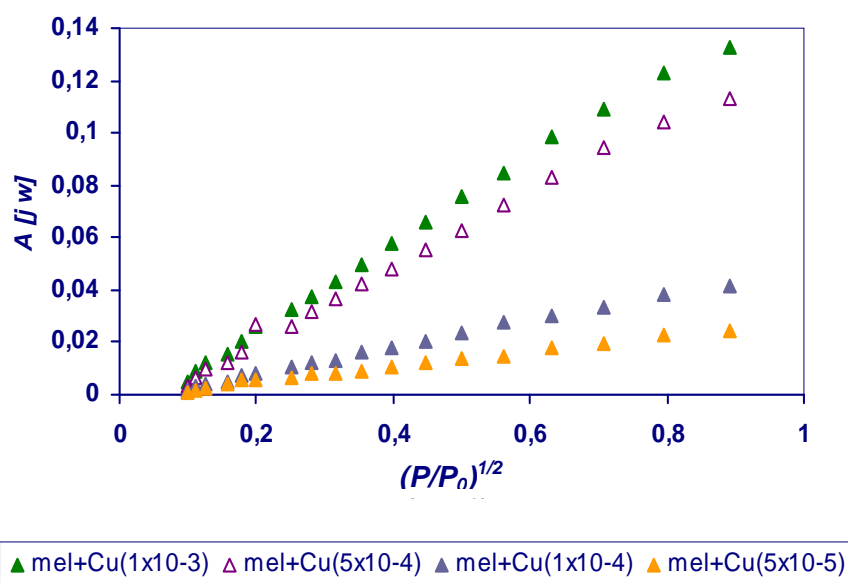
Warto wspomnieć, że znane są z literatury naukowej badania metodą ciągłego nasycenia mikrofalowego sygnału EPR próbek DOPA-melaniny

[137], których rezultat pokazuje, że zarejestrowane linie EPR DOPA-melaniny w obecności porfiryn wykazują poszerzenie niejednorodne.

4.3.2. Wpływ mocy mikrofalowej na widma EPR jonów miedzi(II) w badanych kompleksach DOPA-melaniny

Zbadano także wpływ mocy mikrofalowej na widma EPR jonów miedzi(II) dodanych do melaniny. Analizie poddano amplitudy sygnałów EPR pochodzących od paramagnetycznych jonów miedzi(II). Nie zaobserwowano zjawiska nasycenia mikrofalowego dla sygnału EPR pochodzącego od jonów miedzi(II) dla wszystkich badanych próbek. Podobne rezultaty znane są z literatury [39, 51, 83]. Jony miedzi(II) charakteryzuje krótki czas relaksacji spin-sieć T_1 i dlatego zarejestrowane linie EPR nie nasycają się w zastosowanym zakresie mocy mikrofalowej. W przypadku użycia niskich stężeń jonów metalu (5×10^{-5} M oraz 1×10^{-5} M), z polimerem melaninowym związała się bardzo mała jego ilość (tabela 3, rozdział 3.1.6.) i sygnał EPR pochodzący od jonów Cu(II) nie został zarejestrowany.

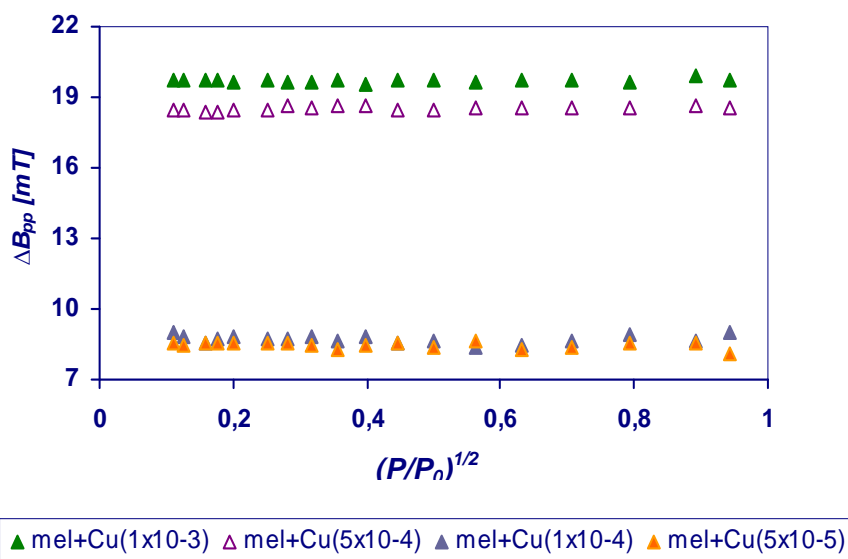
Ze wzrostem stężenia jonów metalu zaobserwowano wzrost amplitudy sygnału EPR pochodzącego od jonów metalu (rys. 49).



Rys. 49. Wpływ mocy mikrofalowej na amplitudę A sygnału EPR jonów miedzi(II) skompleksowanych z DOPA-melaniną. Stężenia jonów Cu(II) wynosiły 5×10^{-5} - 1×10^{-3} M.

Zaobserwowano, że szerokość linii EPR pochodzącej od jonów miedzi(II) zwiększa się nieznacznie ze wzrostem mocy mikrofalowej (rys. 50).

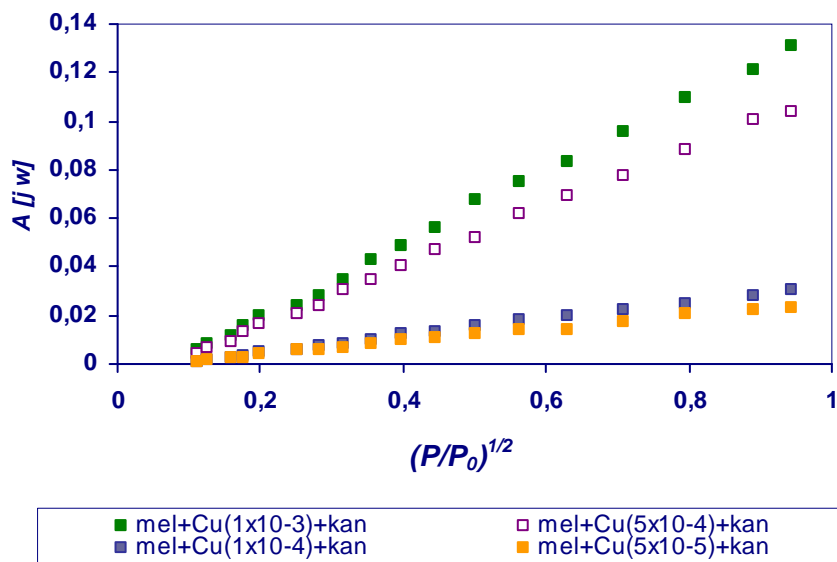
Największą szerokością linii charakteryzują się próbki mel+Cu o najwyższym stężeniu jonów metalu (1×10^{-3} M oraz 5×10^{-4} M) (rys. 50). W przypadku próbek, gdzie użyto niższych stężeń (1×10^{-4} M oraz 5×10^{-5} M), widoczne jest znaczne zwężenie linii EPR.



Rys. 50. Wpływ mocy mikrofalowej na szerokość linii EPR ΔB_{pp} jonów miedzi(II) skompleksowanych z DOPA-melaniną. Stężenia jonów Cu(II) wynosiły 5×10^{-5} - 1×10^{-3} M.

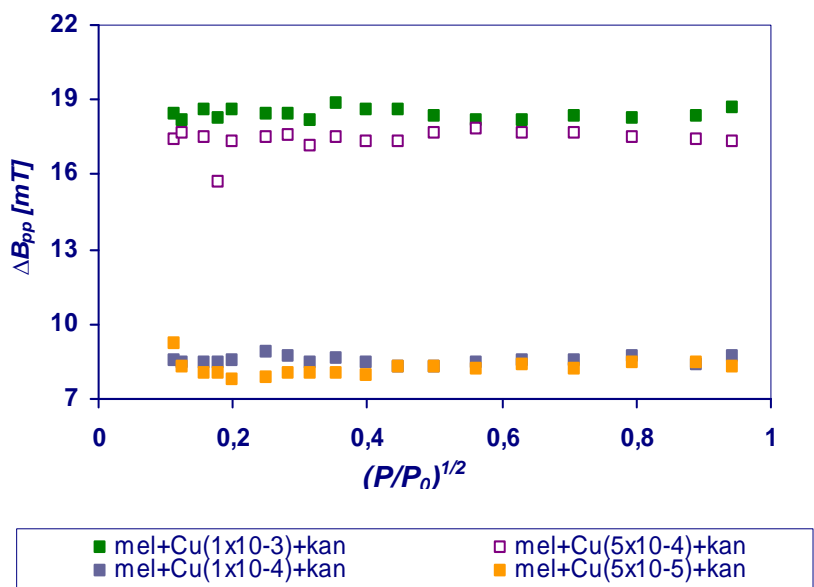
Dodanie kanamycyny do kompleksu melaniny z jonami miedzi(II) nie wywiera dużego wpływu na amplitudę sygnału EPR (rys. 51) w porównaniu z kompleksami mel+Cu (rys. 49). Ze względu na to, że lek został dodany do melaniny po jej kompleksowaniu jonami metalu, nie związała się zbyt duża jego ilość z polimerem (Tabela 2) i dlatego zmiana amplitudy jest mała.

Szerokość linii EPR jonów miedzi(II) zmniejsza się na skutek dodania leku do kompleksów mel+Cu (rys. 50, 52). Większy wpływ leku na zmianę szerokości linii EPR jest widoczny w przypadku dwóch największych użytych stężeń jonów metalu (1×10^{-3} M, 5×10^{-4} M) w przypadku kompleksów mel+Cu oraz mel+Cu+kan (rys. 50, 52).



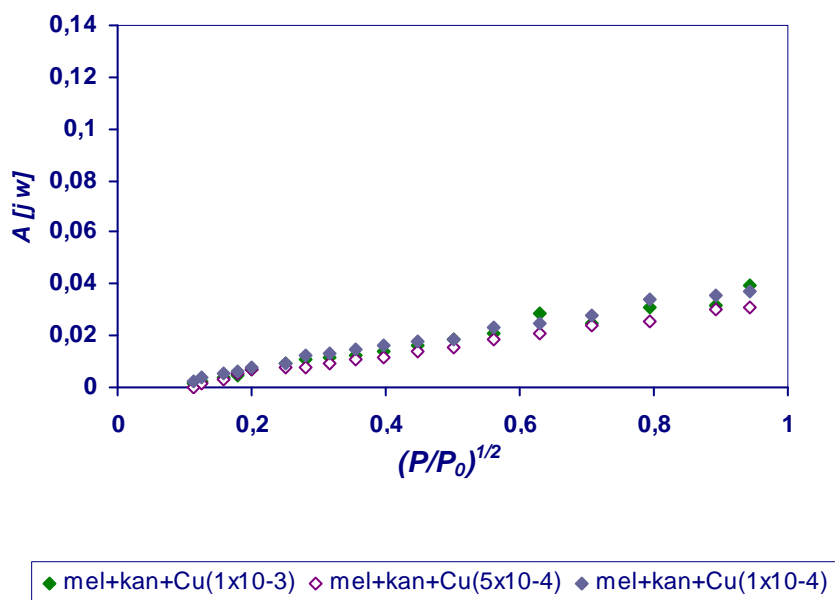
Rys. 51. Wpływ mocy mikrofalowej na amplitudę A sygnału EPR jonów miedzi(II) w kompleksach mel+Cu+kan. Stężenia jonów Cu(II) wynosiły 5×10^{-5} - 1×10^{-3} M

W przypadku kompleksów mel+Cu+kan (rys. 52) zaobserwowano zbliżone do siebie szerokości linii EPR zarejestrowanych dla dwóch największych (1×10^{-3} M, 5×10^{-4} M) oraz dla dwóch najmniejszych stężeń jonów metalu (5×10^{-5} M, 1×10^{-5} M)

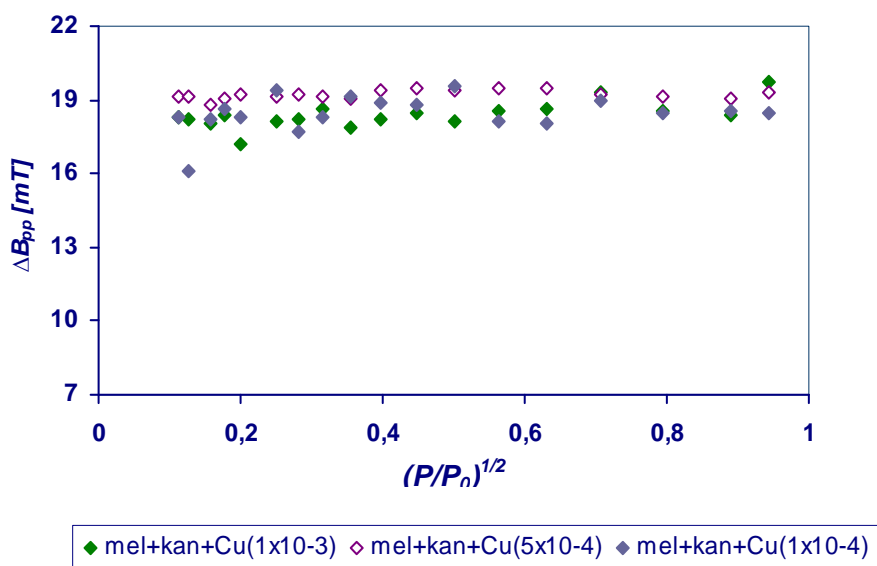


Rys. 52. Wpływ mocy mikrofalowej na szerokość linii EPR ΔB_{pp} jonów miedzi(II) w kompleksach mel+Cu+kan. Stężenia jonów Cu(II) wynosiły 5×10^{-5} - 1×10^{-3} M.

Na rysunku 53 pokazano wzrost amplitudy linii EPR jonów Cu(II) ze wzrostem mocy mikrofalowej dla kompleksów mel+kan+Cu dla różnych stężeń jonów metalu. Na rysunku 54 widać, że w przypadku próbek mel+kan+Cu (dla różnych stężeń jonów miedzi(II)), nie obserwuje się istotnych zmian w szerokości sygnału EPR pochodzącym od jonów miedzi(II).

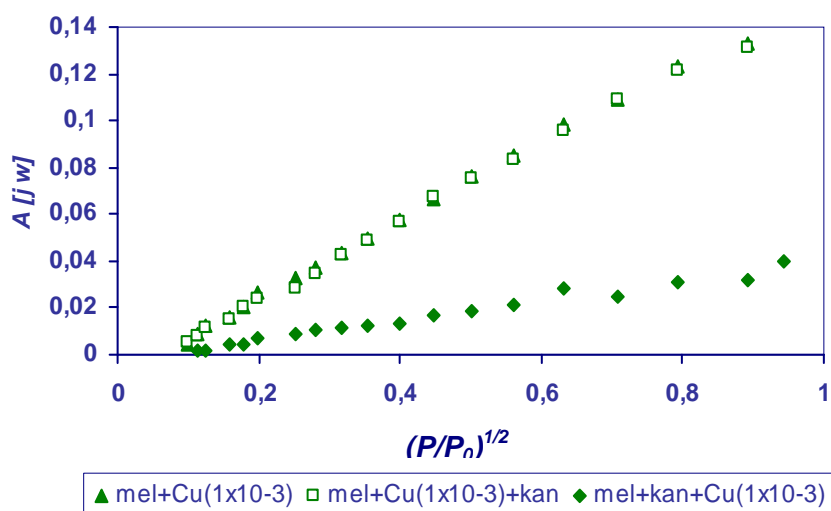


Rys. 53. Wpływ mocy mikrofalowej na amplitudę A sygnału EPR jonów miedzi(II) w kompleksach mel+kan+Cu. Stężenia jonów Cu(II) wynosiły 1×10^{-4} - 1×10^{-3} M.



Rys. 54. Wpływ mocy mikrofalowej na szerokość linii EPR ΔB_{pp} jonów miedzi(II) w kompleksach mel+kan+Cu. Stężenia jonów Cu(II) wynosiły 1×10^{-4} - 1×10^{-3} M.

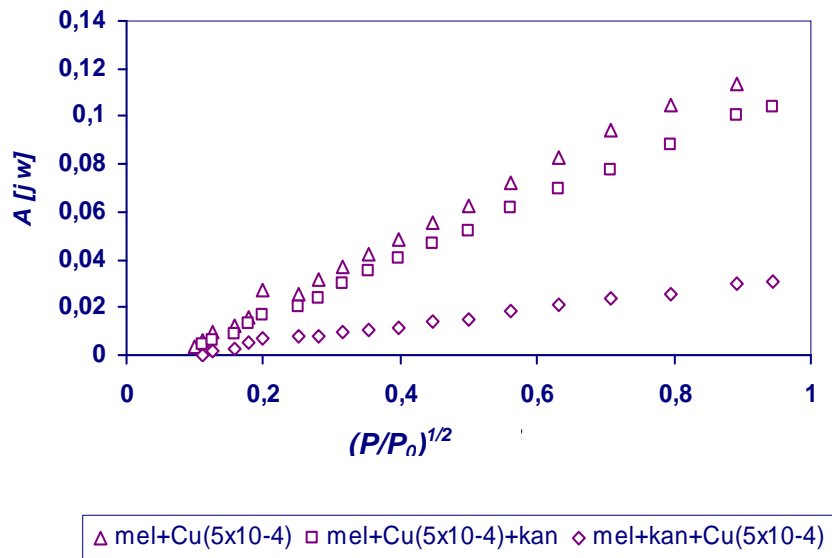
Obserwując wpływ kolejności kompleksowania kanamycyny i jonów metalu do polimeru melaninowego na amplitudę A sygnału EPR jonów Cu(II) przy tym samym stężeniu jonów metalu (1×10^{-3} M lub 5×10^{-4} M), można zaobserwować, że najmniejszą amplitudą charakteryzują się kompleksy mel+kan+Cu (rys. 55, 56). Dodanie leku jako drugiego w kolejności (czyli porównując kompleksy mel+Cu+kan i mel+Cu), ma niewielki wpływ na amplitudę sygnału EPR jonów Cu(II) w przypadku największego stężenia (1×10^{-3} M) (rys. 55), oraz w przypadku stężenia wynoszącego 5×10^{-4} M (rys. 56).



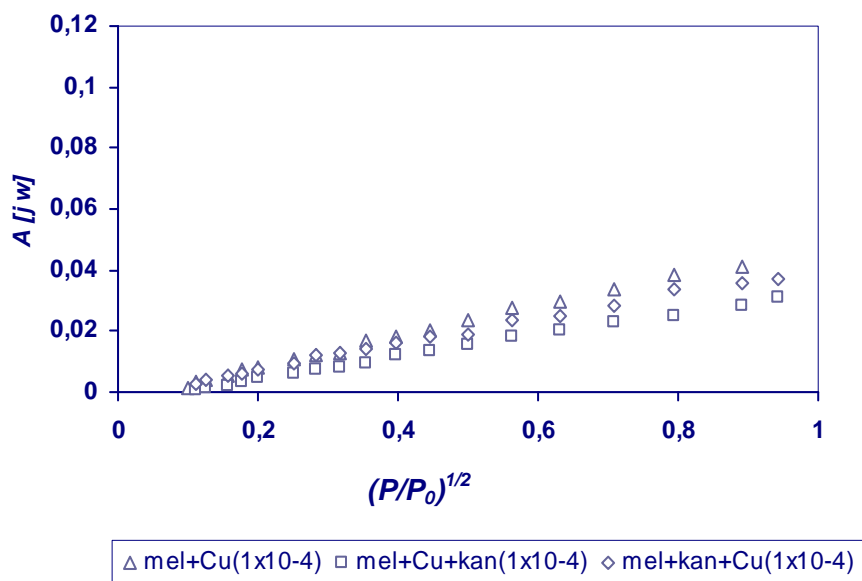
Rys. 55. Wpływ mocy mikrofalowej na amplitudę A sygnału EPR jonów miedzi(II) w kompleksach mel+Cu, mel+Cu+kan i mel+kan+Cu. Stężenie jonów Cu(II) wynosiło 1×10^{-3} M.

Przy niższych stężeniach jonów metalu (1×10^{-4} M) (rys. 57), obserwujemy wzrost sygnału EPR dla kompleksu mel+kan+Cu w porównaniu z sygnałem EPR próbki mel+Cu+kan w obszarze wyższych mocy mikrofalowych.

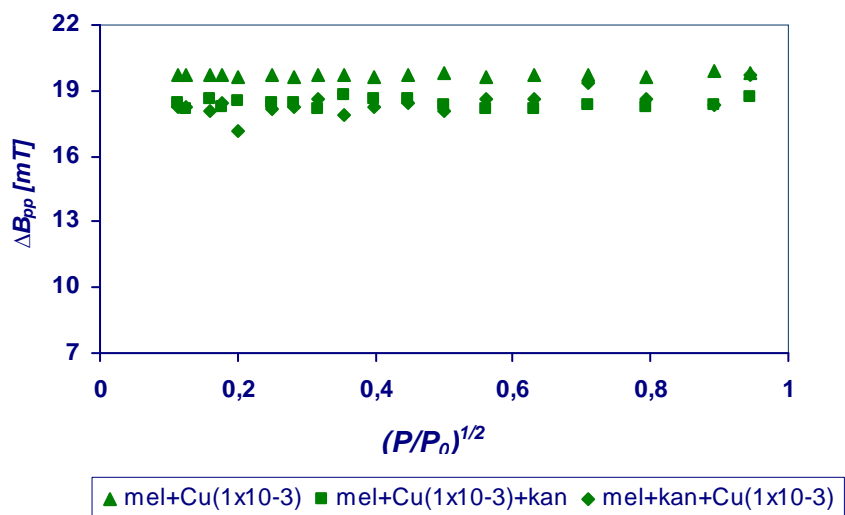
Analizowano szerokość linii ΔB_{pp} EPR jonów metalu w zależności od kolejności kompleksowania leku i jonów metalu do melaniny przy określonym ich stężeniu (rys. 58-60). Na rysunkach tych można zauważyć, że największa szerokość linii EPR jest charakterystyczna dla kompleksów mel+kan+Cu, w przypadku mniejszych stężeń (5×10^{-4} M oraz 1×10^{-4} M) jonów metalu (rys. 59-60).



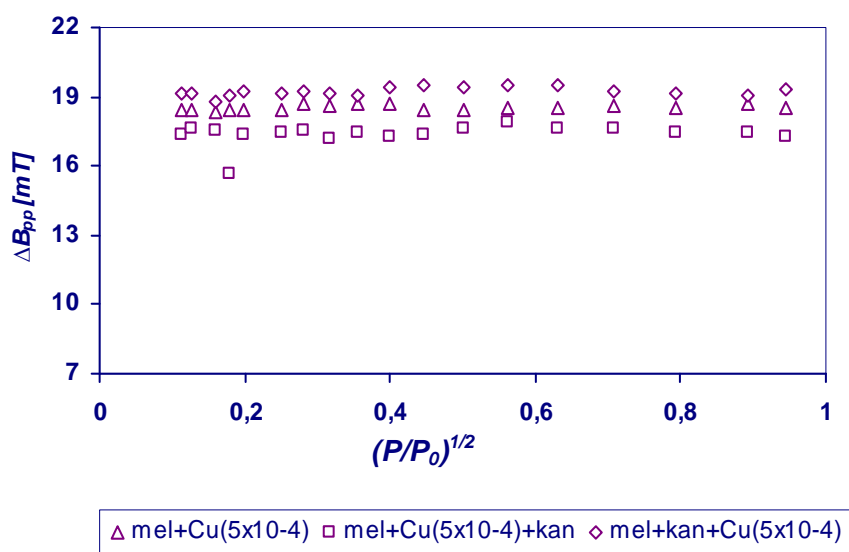
Rys. 56. Wpływ mocy mikrofalowej na amplitudę A sygnału EPR jonów miedzi(II) w kompleksach mel+Cu, mel+Cu+kan i mel+kan+Cu. Stężenie jonów Cu(II) wynosiło 5×10^{-4} M.



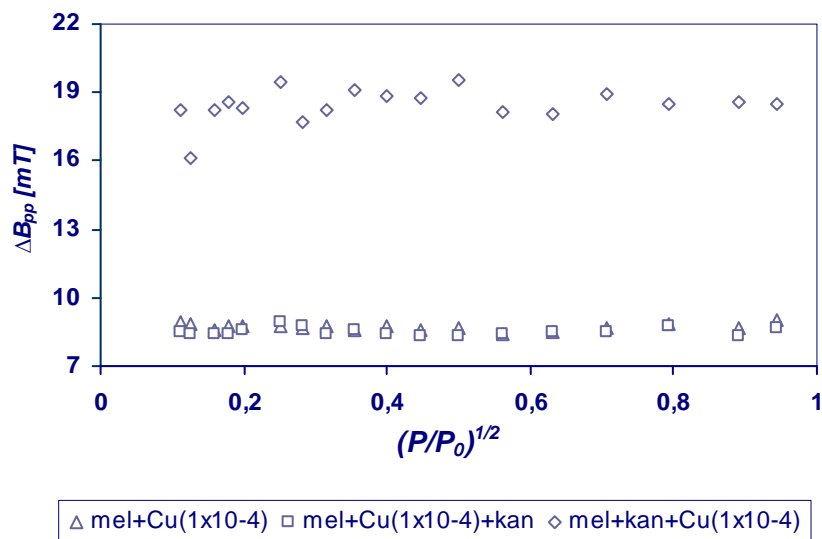
Rys. 57. Wpływ mocy mikrofalowej na amplitudę A sygnału EPR jonów miedzi(II) w kompleksach mel+Cu, mel+kan+Cu, mel+kan+Cu. Stężenie jonów Cu(II) wynosiło 1×10^{-4} M.



Rys. 58. Wpływ mocy mikrofalowej na szerokość linii EPR ΔB_{pp} jonów miedzi(II) w kompleksach mel+Cu, mel+Cu+kan i mel+kan+Cu. Stężenie jonów Cu(II) wynosiło 1×10^{-3} M.

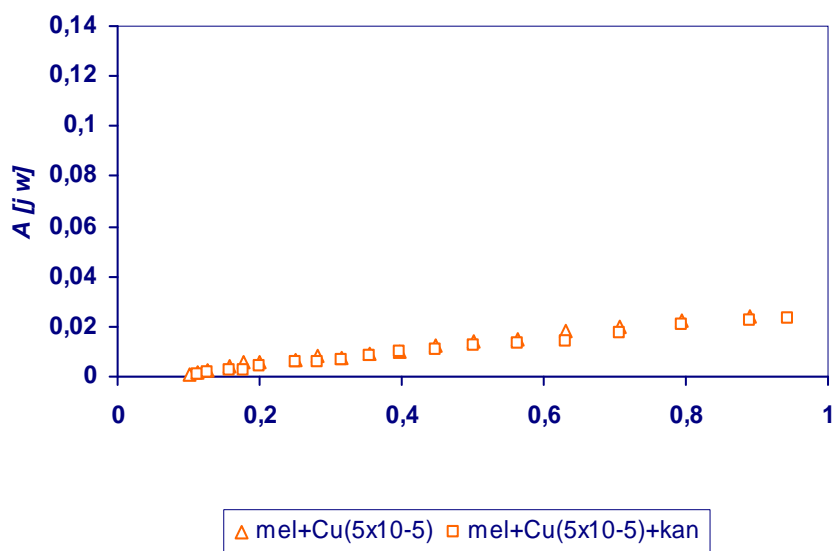


Rys. 59. Wpływ mocy mikrofalowej na szerokość linii EPR ΔB_{pp} jonów miedzi(II) w kompleksach mel+Cu, mel+Cu+kan i mel+kan+Cu. Stężenie jonów Cu(II) wynosiło 5×10^{-4} M.

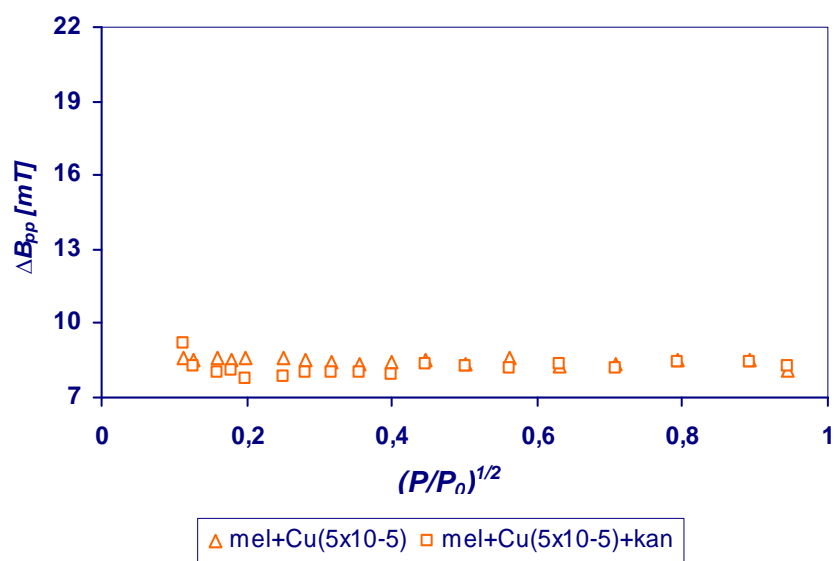


Rys. 60. Wpływ mocy mikrofalowej na szerokość linii EPR ΔB_{pp} jonów miedzi(II) kompleksów mel+Cu, mel+Cu+kan i mel+kan+Cu. Stężenie jonów Cu(II) wynosiło 1×10^{-4} M.

Rysunek 61 oraz 62 przedstawia odpowiednio zależność amplitudy i szerokości linii EPR zapisanych dla próbek mel+Cu i mel+Cu+kan o stężeniu jonów metalu wynoszącym 5×10^{-5} M. Przy tym stężeniu nie widać znaczącego wpływu dodawania kanamycyny do melaniny na wartości badanych parametrów linii EPR. Amplituda linii EPR kompleksów mel+kan i mel+Cu+kan rośnie wraz ze wzrostem mocy mikrofalowej (rys. 61), a linie te nie nasycają się w zakresie mocy mikrofalowych (0,7-70 mW).



Rys. 61. Wpływ mocy mikrofalowej na amplitudę A sygnału EPR jonów miedzi(II) w kompleksach mel+Cu+kan. Stężenie jonów Cu(II) wynosiło 5×10^{-5} M.



Rys. 62. Wpływ mocy mikrofalowej na szerokość linii EPR ΔB_{pp} jonów miedzi(II) w kompleksach mel+Cu+kan. Stężenie jonów Cu(II) wynosiło 5×10^{-5} M.

Jak wspomniano wcześniej, nie zarejestrowano sygnału EPR pochodzącego od jonów miedzi(II) w przypadku stężenia 1×10^{-5} M.

Przeprowadzone badania melaniny oraz jej kompleksów z kanamycyną i jonami miedzi(II) metodą ciągłego nasycenia mikrofalowego widm EPR wykazały odmienne zachowanie się centrów paramagnetycznych

(rodniki melaninowe oraz jony Cu(II)) występujących w rozważanych próbkach w badanym zakresie mocy mikrofalowej. Efekt nasycenia mikrofalowego jest charakterystyczny dla wolnych rodników, natomiast sygnał EPR zarejestrowany dla jonów metalu nie ulega nasyceniu. Metoda ciągłego nasycenia mikrofalowego linii EPR jest stosowana do badania czasu relaksacji spin-sieć T_1 [118]. Dodanie jonów paramagnetycznych do melaniny może powodować skrócenie czasu relaksacji T_1 . Za skrócenie czasu T_1 mogą być odpowiedzialne procesy cross-relaksacji. Kanamycyna nie powoduje zmiany czasu T_1 . Sygnał EPR zarejestrowany w przypadku DOPA-melaniny oraz jej kompleksu z lekiem nasycy się przy podobnej wartości mocy mikrofalowej. Brak zjawiska nasycenia widm EPR paramagnetycznych jonów Cu(II) w zastosowanym zakresie mocy mikrofalowej wskazuje na znacznie krótszy czas relaksacji spin-sieć T_1 jonów miedzi(II), aniżeli układu wolnych rodników melaninowych.

4.4. Termicznie wzbudzone stany trypletowe w kompleksach DOPA-melaniny z kanamycyną i jonami miedzi(II)

4.4.1. Temperaturowa zależność intensywności i szerokości linii sygnału EPR DOPA-melaniny

Dla badanych próbek DOPA-melaniny oraz jej kompleksów z kanamycyną i jonami miedzi(II) poddano analizie intensywność I zarejestrowanych linii EPR oraz iloczyn intensywności I i temperatury T (IT).

Iloczyn IT będący sumą iloczynów pochodzących od centrów paramagnetycznych o spinie $S = \frac{1}{2}$ oraz o spinie $S = 1$ dany jest równaniem

$$IT = C + \frac{B}{3 + \exp(J/kT)} \quad (13).$$

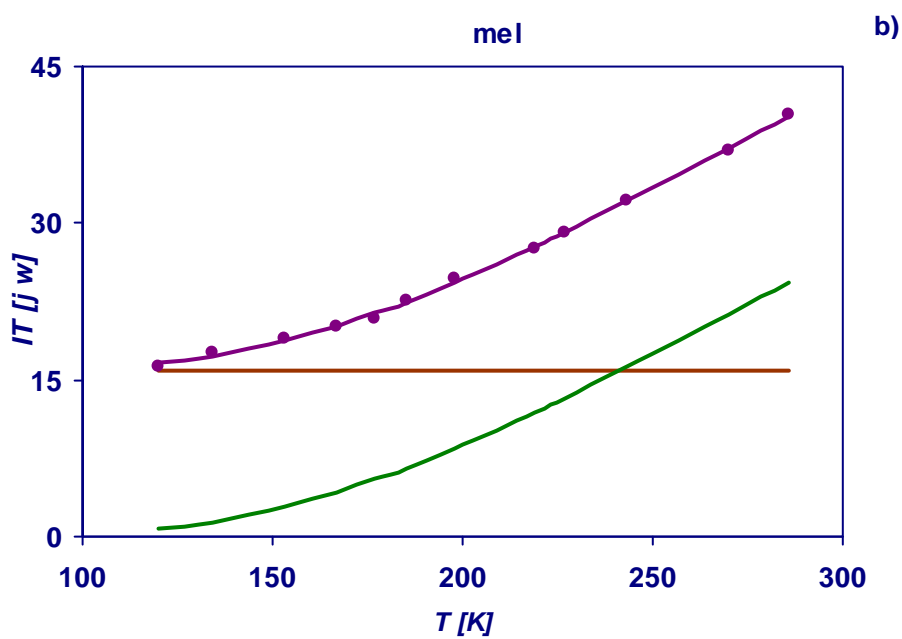
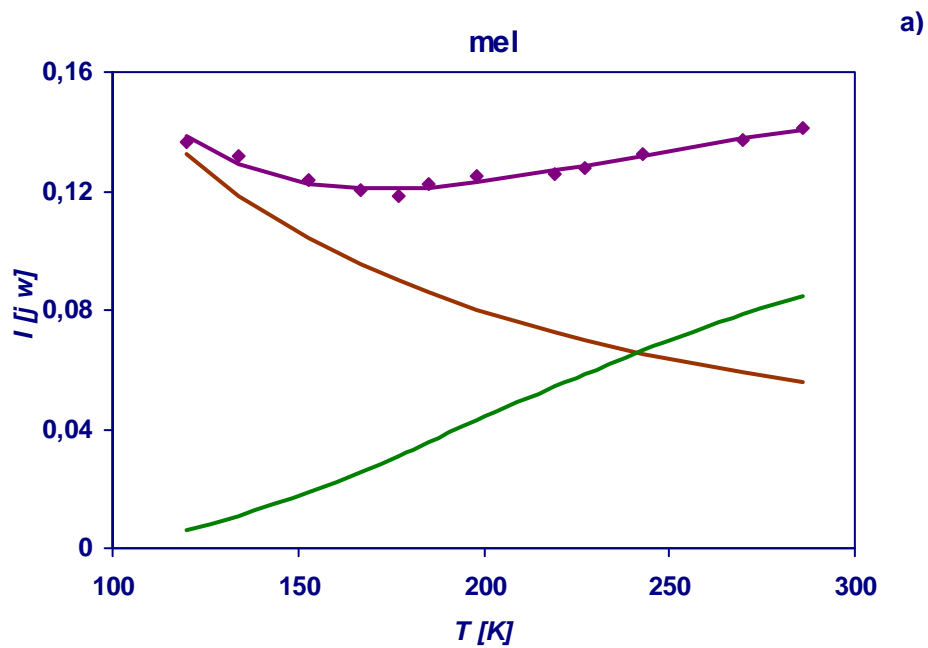
Zależność intensywności I widma EPR od temperatury T pomiaru otrzymana z doświadczenia została numerycznie dopasowana przez zależność podaną powyżej. Dopasowując otrzymane rezultaty wybrano funkcję mającą sens fizyczny. Ważną kwestią w analizie wyników pomiarów temperaturowych jest zarówno uzyskanie zadowalającego stopnia dopasowania danych doświadczalnych z proponowanym modelem teoretycznym, jak również dobrej interpretacji merytorycznej [138].

Rysunki 63a-67a przedstawiają zależność całkowitej intensywności I linii EPR od temperatury pomiaru T dla badanych próbek, będącej sumą intensywności pochodzących od centrów paramagnetycznych o spinie $S = \frac{1}{2}$ oraz o spinie $S = 1$, dla linii EPR zarejestrowanej w przedziale 100–300 K. Jedną z krzywych (brązowa) odpowiada centrom paramagnetycznym znajdującym się w podstawowym stanie dubletowym o spinie $S = \frac{1}{2}$. Przebieg tej krzywej jest zgodny z prawem Curie (ze wzrostem temperatury maleje intensywność linii EPR). Krzywa zielona przedstawia zależność intensywności linii EPR od temperatury pomiaru T dla centrów paramagnetycznych będących we wzbudzonym termicznie stanie trypletowym o spinie $S = 1$. W przypadku tej krzywej obserwowany jest wraz ze wzrostem temperatury pomiaru wzrost intensywności linii EPR pochodzącej od centrów paramagnetycznych o spinie $S = 1$. Suma tych

dwóch intensywności daje całkowitą intensywność I linii EPR w zastosowanym przedziale temperatury pomiaru (rys. 63a-67a).

Na rysunkach 63b-67b pokazany jest również udział iloczynów IT odpowiadających centrów paramagnetycznym o spinie $S = \frac{1}{2}$ oraz o spinie $S = 1$ w całkowitym iloczynie IT . Krzywa dla centrów paramagnetycznych o spinie $S = \frac{1}{2}$ (brązowa) zachowuje się zgodnie z prawem Curie (iloczyn IT jest stały w całym stosowanym zakresie temperatury pomiaru). Przebieg krzywej dla centrów paramagnetycznych (zielona) będących we wzbudzonym termicznie stanie nie spełnia prawa Curie (wraz ze wzrostem temperatury widoczny jest wzrost iloczynu IT).

Dodanie jonów miedzi(II) do DOPA-melaniny, powoduje obniżenie intensywności linii EPR w przypadku próbek mel+Cu oraz mel+Cu+kan (rys. 65, 67) i znaczną przewagę centrów paramagnetycznych w podstawowym stanie dubletowym ($S = \frac{1}{2}$) nad centrami w termicznie wzbudzonym stanie trypletowym ($S = 1$). W przypadku pozostałych próbek (rys. 63, 64, 66) efekt ten nie jest obserwowany. Centra paramagnetyczne w termicznie wzbudzonym stanie o spinie $S = 1$ przeważają od pewnej temperatury nad grupą centrów paramagnetycznych o spinie $S = \frac{1}{2}$. W przypadku DOPA-melaniny temperatura ta wynosi ok. 250 K, a w przypadku kompleksu mel+kan wynosi 170 K. Można wysunąć hipotezę, że pod wpływem dodania leku do polimeru melaninowego zwiększa się ilość centrów paramagnetycznych o spinie $S = 1$. Ponieważ mechanizm wiązania leków do melaniny nie jest dostatecznie poznany [17, 30, 43, 50-51, 133] nie można dokładnie wyjaśnić zaobserwowanego efektu. Wiadomo, że intensywność widma EPR melaniny zwiększa się pod wpływem dodania leku [17, 50-51, 81, 133]. Zmiany takie są dobrze widoczne w temperaturze pokojowej. Rezultaty takie znane są z literatury [17, 50-51, 81, 133] oraz z wyników otrzymanych w tej pracy. Prawdopodobnie mają miejsce pod wpływem temperatury reakcje związane z przeniesieniem ładunku (*charge-transfer*) prowadzące do zmiany konfiguracji elektronowej badanych kompleksów.



Rys. 63.

- a) Wykres zależności intensywności I od temperatury pomiaru T dla DOPA-melaniny
 b) Wykres zależności iloczynu IT od temperatury pomiaru T dla DOPA-melaniny

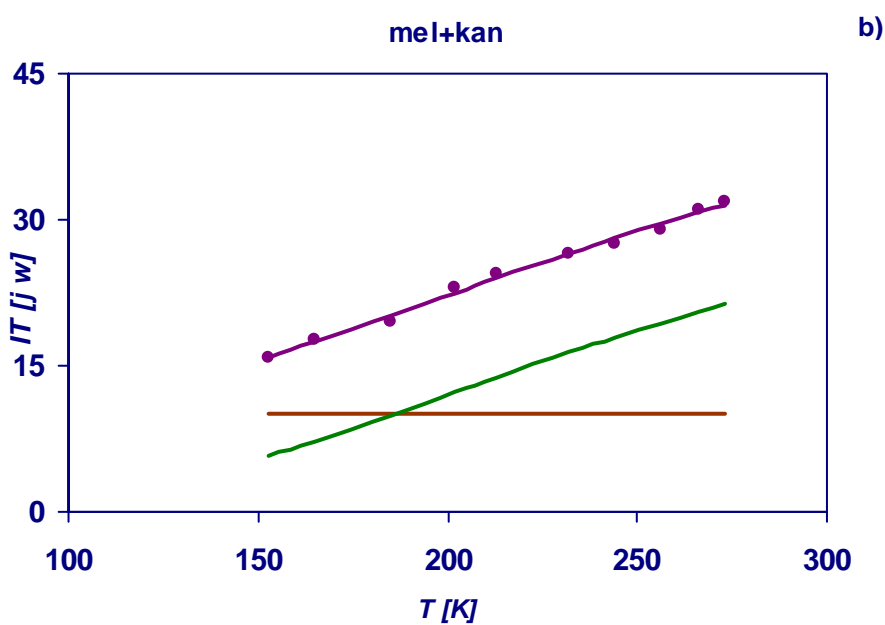
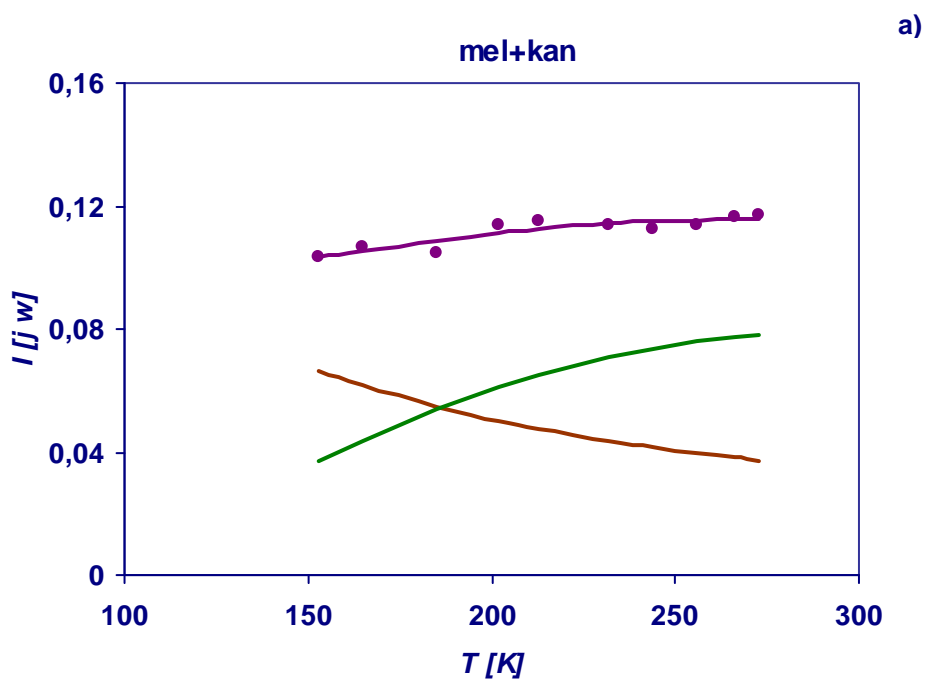
- punkty doświadczalne
- krzywa teoretyczna
- krzywa dla centrów paramagnetycznych o spinie $S = \frac{1}{2}$
- krzywa dla centrów paramagnetycznych termicznie wzbudzonych o spinie $S = 1$.

a)

$$\begin{aligned} J/k &= 76,1K \\ B &= 419,1 \\ C &= 15,9 \end{aligned}$$

b)

$$\begin{aligned} J/k &= 76,8 K \\ B &= 427,6 \\ C &= 16,0 \end{aligned}$$



Rys. 64.

- a) Wykres zależności intensywności I od temperatury pomiaru T dla kompleksu (DOPA-melanina)-kanamycyna
- b) Wykres zależności iloczynu itd. temperatury pomiaru T dla kompleksu (DOPA-melanina)-kanamycyna

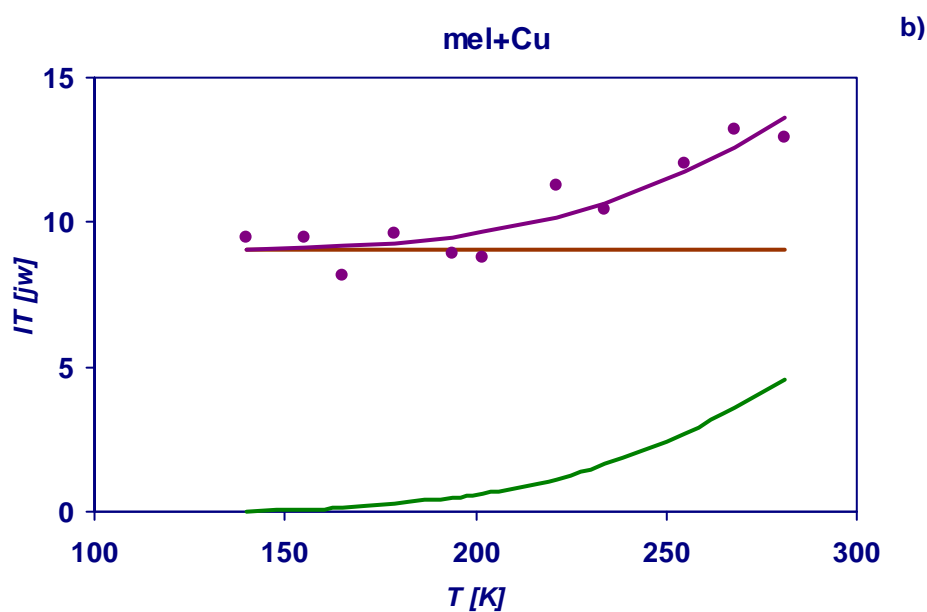
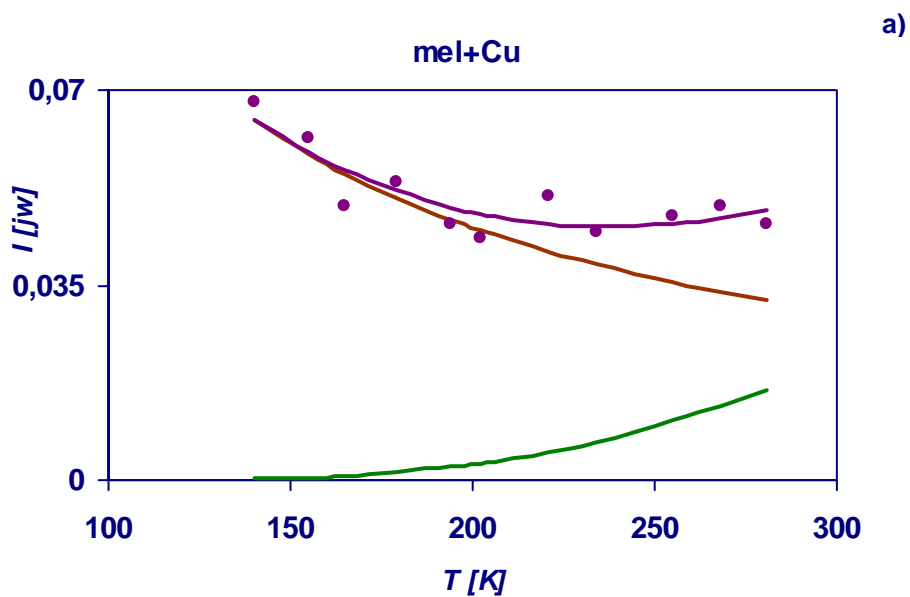
- punkty doświadczalne
- krzywa teoretyczna
- krzywa dla centrów paramagnetycznych o spinie $S = \frac{1}{2}$
- krzywa dla centrów paramagnetycznych termicznie wzbudzonych o spinie $S = 1$.

a)

$J/k = 55,0$ K
 $B = 224,2$
 $C = 10,1$

b)

$J/k = 55,8$ K
 $B = 226,9$
 $C = 10,4$



Rys. 65.

- a) Wykres zależności intensywności I od temperatury pomiaru T dla kompleksu (DOPA-melanina)-Cu(II)
- b) Wykres zależności iloczynu IT od temperatury pomiaru T dla kompleksu (DOPA-melanina)-Cu(II)

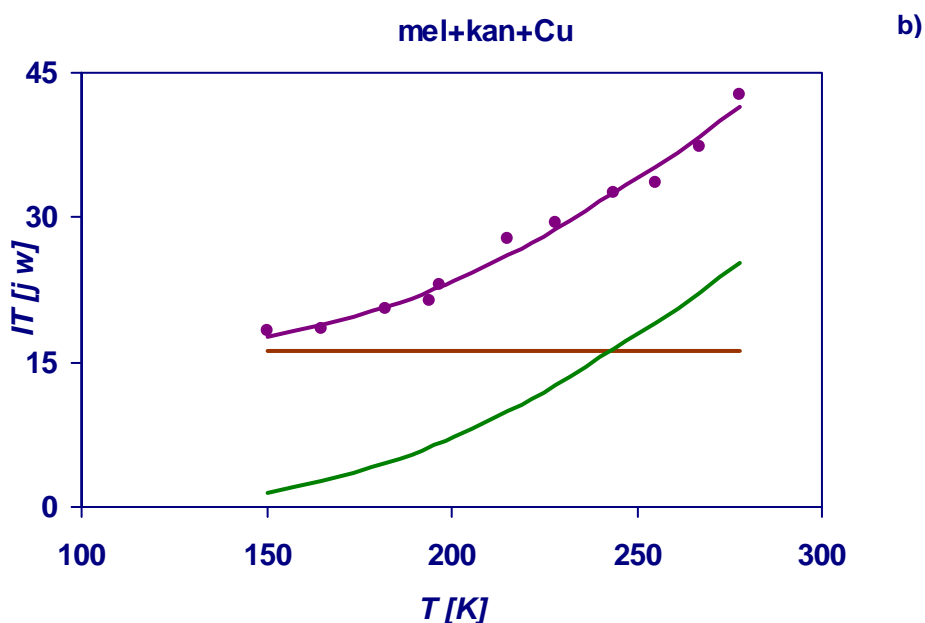
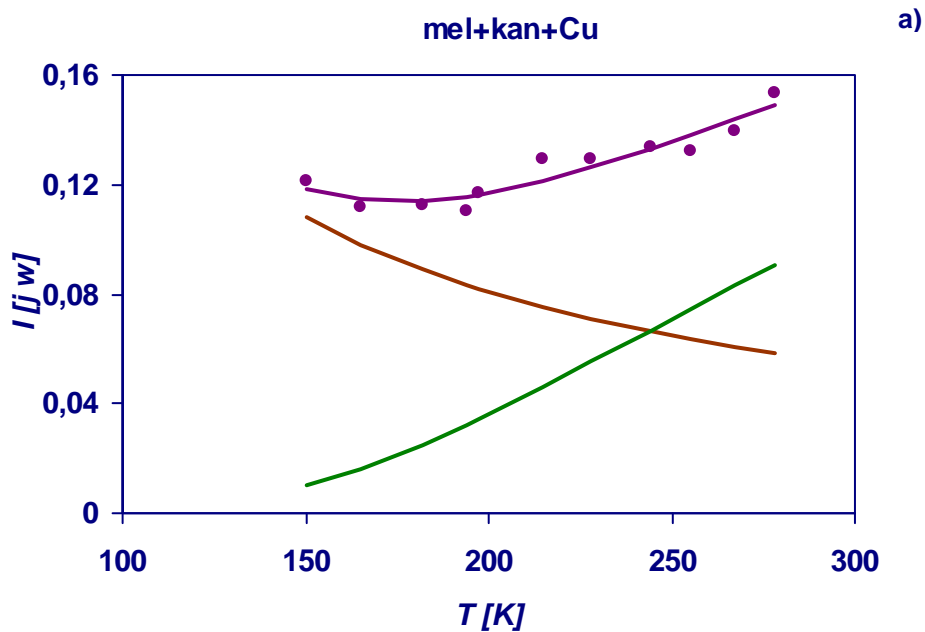
- punkty doświadczalne
- krzywa teoretyczna
- krzywa dla centrów paramagnetycznych o spinie $S = \frac{1}{2}$
- krzywa dla centrów paramagnetycznych termicznie wzbudzonych o spinie $S = 1$.

a)

$J/k = 145,4$ K
 $B = 821,5$
 $C = 9,1$

b)

$J/k = 125,6$ K
 $B = 415,4$
 $C = 8,9$



Rys. 66.

- a) Wykres zależności intensywności I od temperatury pomiaru T dla kompleksu [(DOPA-melanina)-kanamycyna]-Cu(II)
- b) Wykres zależności iloczynu IT od temperatury pomiaru T dla kompleksu [(DOPA-melanina)-kanamycyna]-Cu(II)

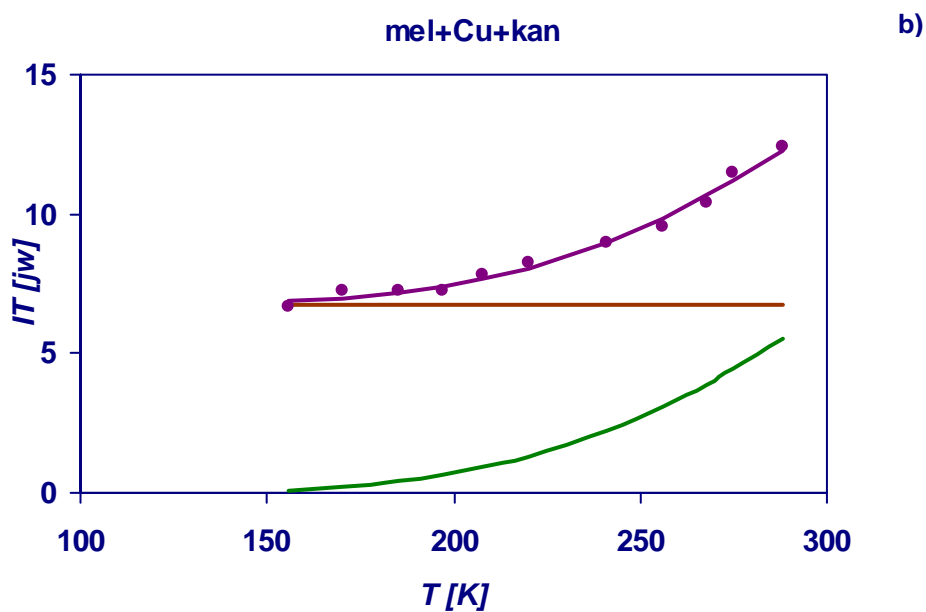
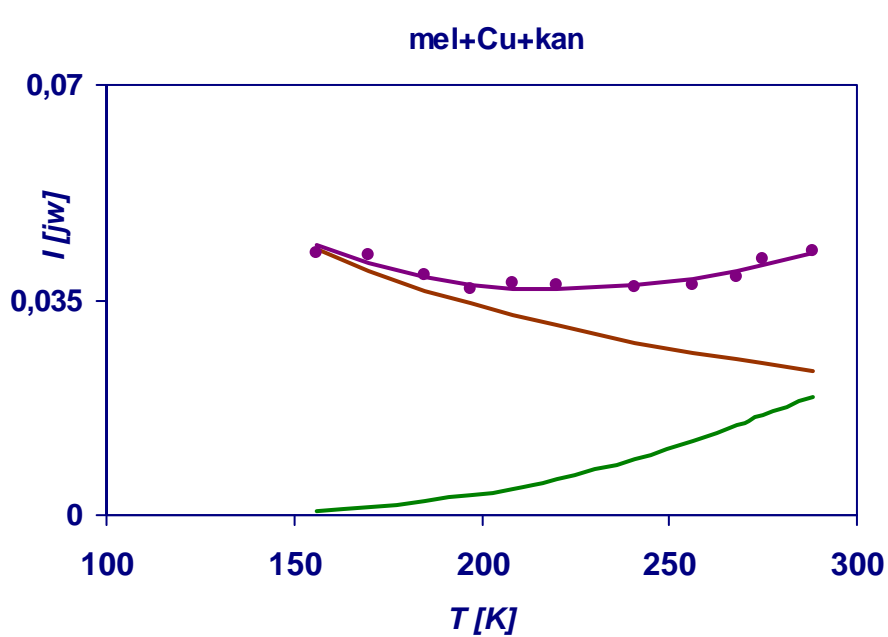
- punkty doświadczalne
- krzywa teoretyczna
- krzywa dla centrów paramagnetycznych o spinie $S = \frac{1}{2}$
- krzywa dla centrów paramagnetycznych termicznie wzbudzonych o spinie $S = 1$.

a)

$J/k = 94,2$ K
 $B = 824,4$
 $C = 16,2$

b)

$J/k = 94,2$ K
 $B = 822,9$
 $C = 16,2$



Rys. 67.

- a) Wykres zależności intensywności I od temperatury pomiaru T dla kompleksu [(DOPA-melanina)-Cu(II)]-kanamycyna
- b) Wykres zależności iloczynu IT od temperatury pomiaru T dla kompleksu [(DOPA-melanina)-Cu(II)]-kanamycyna

• punkty doświadczalne

- krzywa teoretyczna

- krzywa dla centrów paramagnetycznych o spinie $S = \frac{1}{2}$

- krzywa dla centrów paramagnetycznych termicznie wzbudzonych o spinie $S = 1$.

a)

$$J/k = 136,5 \text{ K}$$

$$B = 647,8$$

$$C = 6,8$$

b)

$$J/k = 144,7 \text{ K}$$

$$B = 855,2$$

$$C = 6,9$$

Jony paramagnetyczne powodują obniżenie intensywności widma EPR DOPA-melaniny. Znane są z literatury badania spadku intensywności widma EPR melaniny wraz ze wzrostem stężenia dodawanego jonu paramagnetycznego [50-51, 82-83]. Nie są znane z literatury naukowej temperaturowe badania zmian intensywności widma EPR kompleksów DOPA-melaniny z jonami metalu i substancją leczniczą – kanamycyną, które zostały wykonane po raz pierwszy w niniejszej pracy.

W przypadku kompleksów wieloskładnikowych rolę odgrywa kolejność dodawania czynników kompleksujących (rys. 64-67). Dodanie jonów metalu jako pierwszego składnika blokuje miejsca wiążące dla leku [17, 50, 51]. W tej sytuacji nie obserwuje się już tak istotnego wpływu leku na intensywność I oraz iloczynu IT w przypadku centrów paramagnetycznych we wzbudzonym stanie trypletowym (rys. 65, 67). Jeżeli jako pierwszy składnik dodany jest lek do melaniny mamy sytuację przeciwną (rys. 64, 66). Mianowicie lek blokuje miejsca wiążące dla jonów metalu. Temperatura, od której przeważają centra paramagnetyczne o spinie $S = 1$, jest taka jak w przypadku czystej DOPA-melaniny, czyli niższa niż w przypadku kompleksu melaniny z samym tylko lekiem. W badanym zakresie temperatur, w przypadku kompleksu melaniny z jonami metalu oraz kompleksu, gdzie jako pierwsze zostały dodane jony miedzi(II) a następnie lek, nie obserwuje się przy żadnej temperaturze pomiaru przewagi intensywności I oraz iloczynu IT dla centrów paramagnetycznych o spinie $S = 1$ w porównaniu z centrami paramagnetycznymi o spinie $S = \frac{1}{2}$. Przypuszczalnym wytłumaczeniem tego zjawiska jest to, że jony metalu zablokowały znaczną ilość miejsc wiążących w melaninie i dlatego z polimerem związała się mniejsza ilość leku.

Dane zamieszczone w tabeli 6 pokazują, że wartości energii wzbudzeń singlet-tryplet J/k dla badanych próbek są różne.

Najniższą energią wzbudzenia charakteryzuje się kompleks melaniny z lekiem, a najwyższą kompleksy melaniny z jonami metalu (Tabela 6). Można powiedzieć, że po dodaniu jonów miedzi(II) do melaniny wymagana jest większa energia wzbudzenia singlet-tryplet J/k . Wzrost energii wzbudzenia jest uzależniony również od kolejności dodawania kanamycyny i jonów Cu(II) do melaniny. W przypadku DOPA-melaniny oraz jej kompleksu z lekiem otrzymano najniższe wartości energii wzbudzenia J/k . Dodanie kanamycyny do polimeru melaninowego spowodowało obniżenie wartości

energii wzbudzenia J/k . Fakt ten potwierdza wcześniej wysunięte przypuszczenie, że lek umożliwia „lepszą” obserwację centrów paramagnetycznych znajdujących się w termicznie wzbudzonym stanie o spinie $S = 1$, tzn. znaczną ich przewagę nad centrami paramagnetycznymi będącymi w stanie o spinie $S = \frac{1}{2}$ (rys. 64-65, Tabela 6). W przypadku kompleksów, do których jako pierwsze wprowadzone zostały jony metalu, stwierdzono znaczny wzrost energii wzbudzenia oraz przewagę centrów paramagnetycznych o spinie $S = \frac{1}{2}$ (rys. 65, 67).

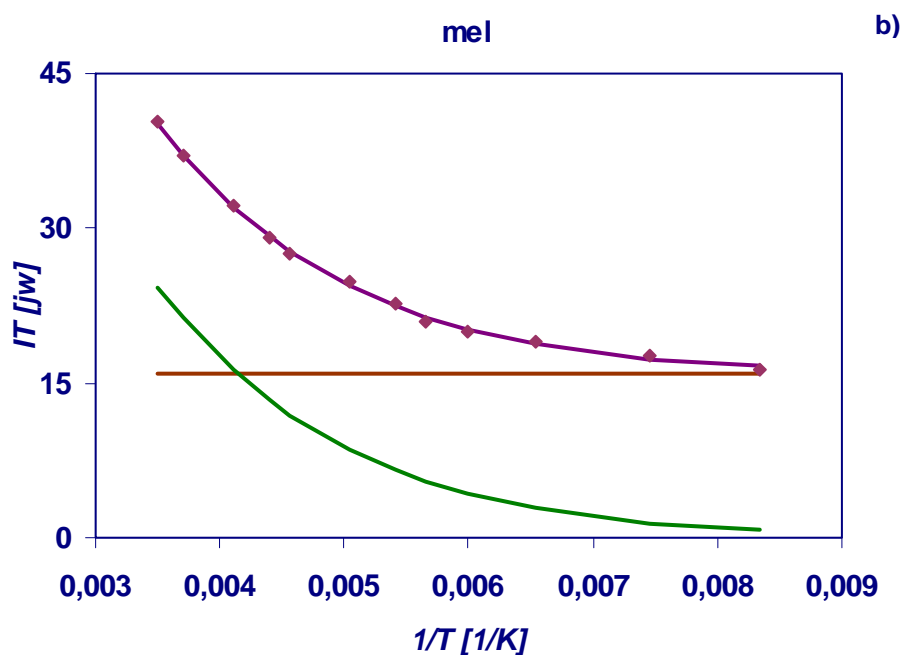
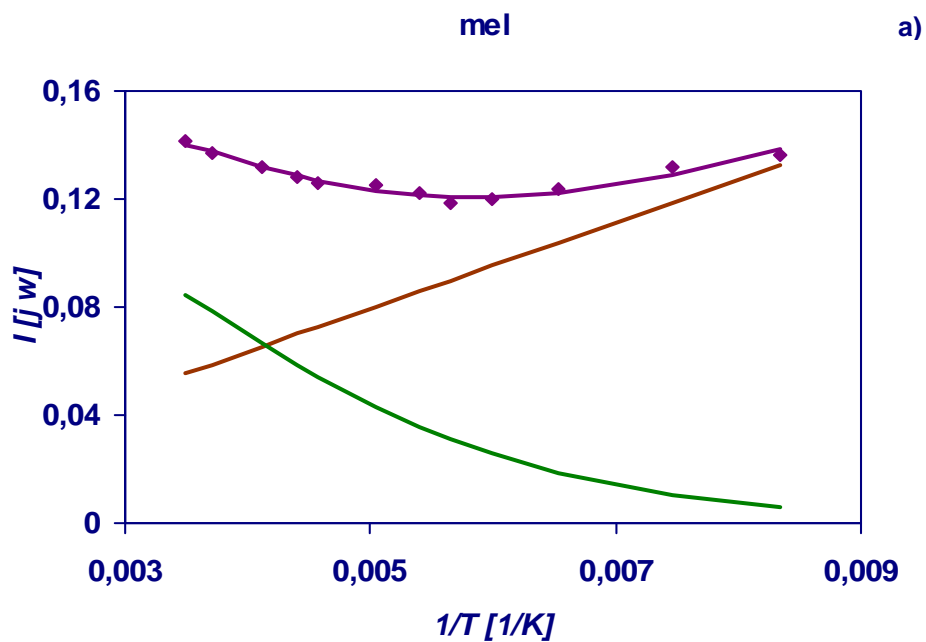
Przedstawiono również wykresy zależności intensywności I linii EPR badanych próbek melaninowych oraz wykresy zależności iloczynu IT od odwrotności temperatury $1/T$ (rys. 68-72). Podobnie jak na rysunkach 63-67 pokazana jest zależność całkowitej intensywności linii EPR oraz całkowitego iloczynu IT oraz odpowiednie ich składowe dla dwóch rozważanych grup centrów paramagnetycznych. Centra paramagnetyczne o spinie $S = \frac{1}{2}$ zachowują się zgodnie z prawem Curie, natomiast centra paramagnetyczne o spinie $S = 1$ nie spełniają tego prawa.

Numeryczną analizę wyników przeprowadzono z zastosowaniem programu STATISTICA PL 5.1 firmy SYSTAT [139]. Po podaniu modelu teoretycznego, wybrano jedną z metod estymacji nieliniowej dostępną w pakiecie programu STATISTICA PL 5.1 – metodę quasi-Newtona [138-139]. Metoda ta w większości zastosowań, jest najszybszą metodą osiągnięcia zbieżności. Polega ona na szacowaniu funkcji w celu estymacji pochodnych pierwszego i drugiego rzędu. Pochodne te informują o kierunku i szybkości zmian nachylenia funkcji, które algorytm wykorzystuje w celu osiągnięcia minimum funkcji straty. Funkcja straty określa wielkość odchylenia wartości przewidywanych od wartości obserwowanych. Stopień dopasowania modelu do danych doświadczalnych oceniono za pomocą współczynnika determinacji R^2 określającego, jaki procent zmienności (wariancji) cechy zależnej jest wyjaśniony przez model (Tabela 7).

Tabela 6. Wartości parametrów J/k , B oraz C wyznaczone dla modelu jednoczesnego istnienia stanu trypletowego ($S = 1$) i dubletowego ($S = 1/2$) w DOPA-melaninie oraz w jej kompleksach z kanamycyną i jonami miedzi(II) (równanie (13)).

Próbka	Funkcja	Model jednoczesnego występowania stanu trypletowego ($S = 1$) i dubletowego ($S = 1/2$)		
		J/k [K]	B	C
(DOPA-melanina)	$I = f(T)$	76,1	419,1	15,9
	$I = f(1/T)$			
	$IT = f(T)$	76,8	427,6	16,0
	$IT = f(1/T)$			
(DOPA-melanina)-kanamycyna	$I = f(T)$	55,0	224,2	10,1
	$I = f(1/T)$			
	$IT = f(T)$	55,8	226,9	10,4
	$IT = f(1/T)$			
(DOPA-melanina)-Cu(II)	$I = f(T)$	145,4	821,5	9,1
	$I = f(1/T)$			
	$IT = f(T)$	125,6	415,4	8,9
	$IT = f(1/T)$			
[(DOPA-melanina)-kanamycyna]-Cu(II)	$I = f(T)$	94,2	824,4	16,2
	$I = f(1/T)$			
	$IT = f(T)$	94,2	822,9	16,2
	$IT = f(1/T)$			
[(DOPA-melanina)-Cu(II)]-kanamycyna	$I = f(T)$	136,5	647,8	6,8
	$I = f(1/T)$			
	$IT = f(T)$	144,7	855,2	6,9
	$IT = f(1/T)$			

Wszystkie podane parametry były istotne statystycznie.



Rys. 68.

- a) Wykres zależności intensywności I od odwrotności temperatury pomiaru $1/T$ dla DOPA-melaniny
- b) Wykres zależności iloczynu IT intensywności I oraz temperatury pomiaru T od odwrotności temperatury $1/T$ dla DOPA-melaniny

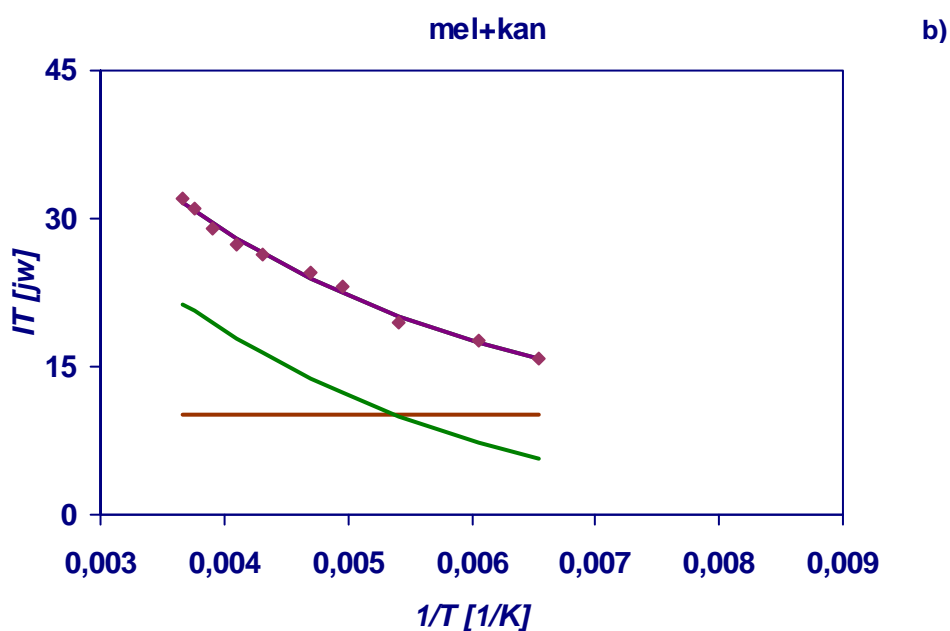
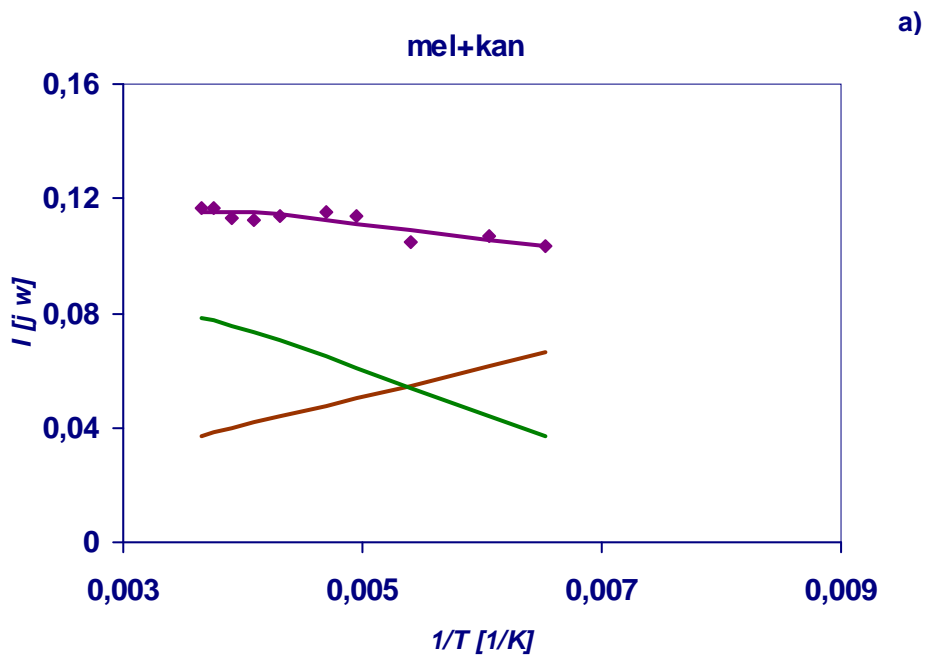
- punkty doświadczalne
- krzywa teoretyczna
- krzywa dla centrów paramagnetycznych o spinie $S = \frac{1}{2}$
- krzywa dla centrów paramagnetycznych termicznie wzbudzonych o spinie $S = 1$.

a)

$J/k = 76,1K$
 $B = 419,1$
 $C = 15,9$

b)

$J/k = 76,8 K$
 $B = 427,6$
 $C = 16,0$



Rys. 69.

- a) Wykres zależności intensywności I od odwrotności temperatury pomiaru $1/T$ dla kompleksu (DOPA-melanina)-kanamycyna
- b) Wykres zależności iloczynu IT intensywności I oraz temperatury pomiaru T od odwrotności temperatury $1/T$ dla kompleksu (DOPA-melanina)-kanamycyna

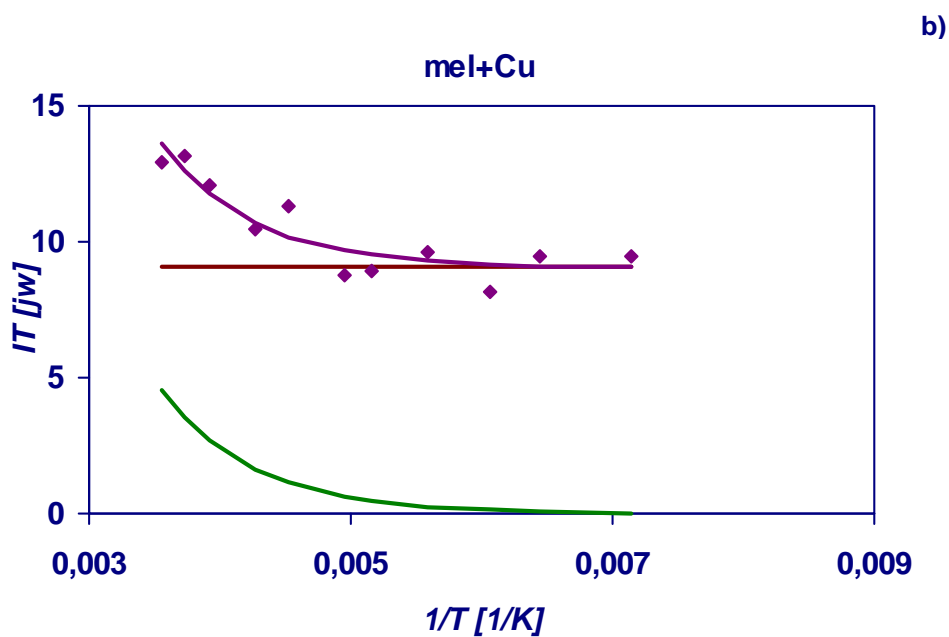
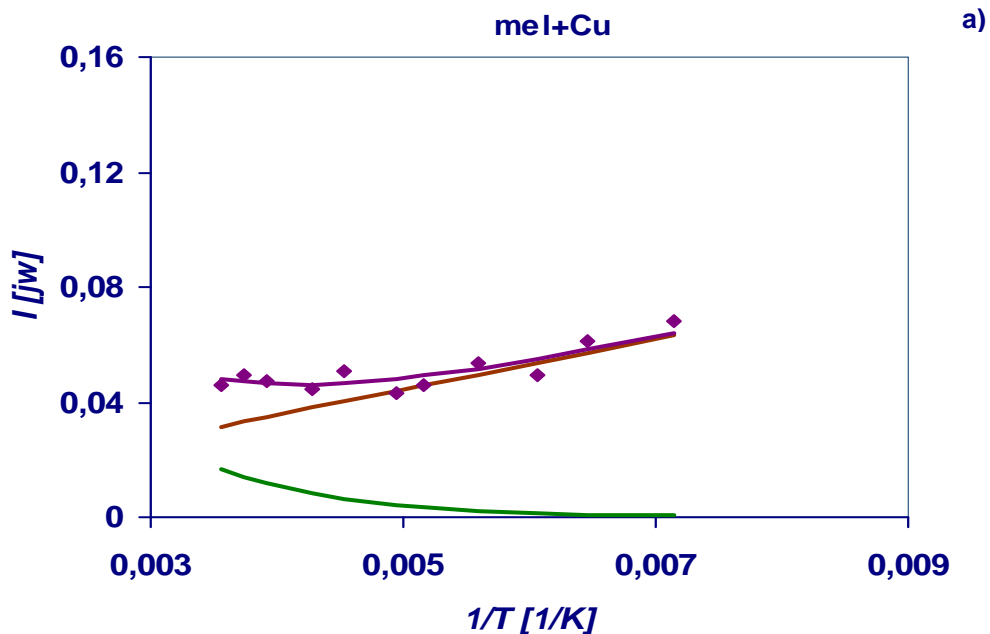
- punkty doświadczalne
- krzywa teoretyczna
- krzywa dla centrów paramagnetycznych o spinie $S = \frac{1}{2}$
- krzywa dla centrów paramagnetycznych termicznie wzbudzonych o spinie $S = 1$.

a)

b)

$J/k = 55,0$ K
 $B = 224,2$
 $C = 10,1$

$J/k = 55,8$ K
 $B = 226,9$
 $C = 10,4$



Rys. 70.

- a) Wykres zależności intensywności I od odwrotności temperatury pomiaru $1/T$ dla kompleksu (DOPA-melanina)-Cu(II)
- b) Wykres zależności iloczynu IT intensywności I oraz temperatury pomiaru T od odwrotności temperatury $1/T$ dla kompleksu (DOPA-melanina)-Cu(II)

• punkty doświadczalne

- krzywa teoretyczna

- krzywa dla centrów paramagnetycznych o spinie $S = \frac{1}{2}$

- krzywa dla centrów paramagnetycznych termicznie wzbudzonych o spinie $S = 1$.

a)

$$J/k = 145,4 \text{ K}$$

$$B = 821,5$$

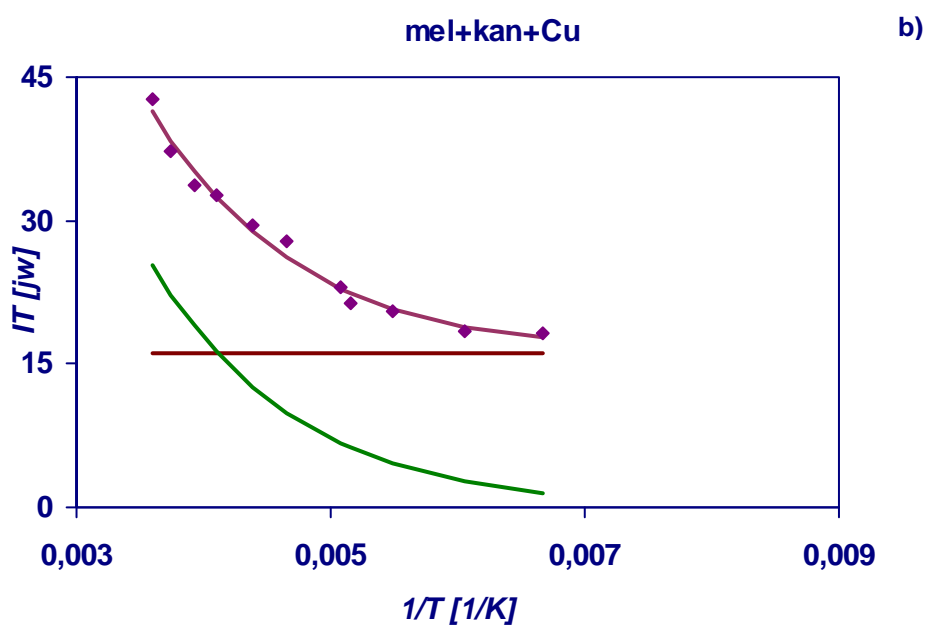
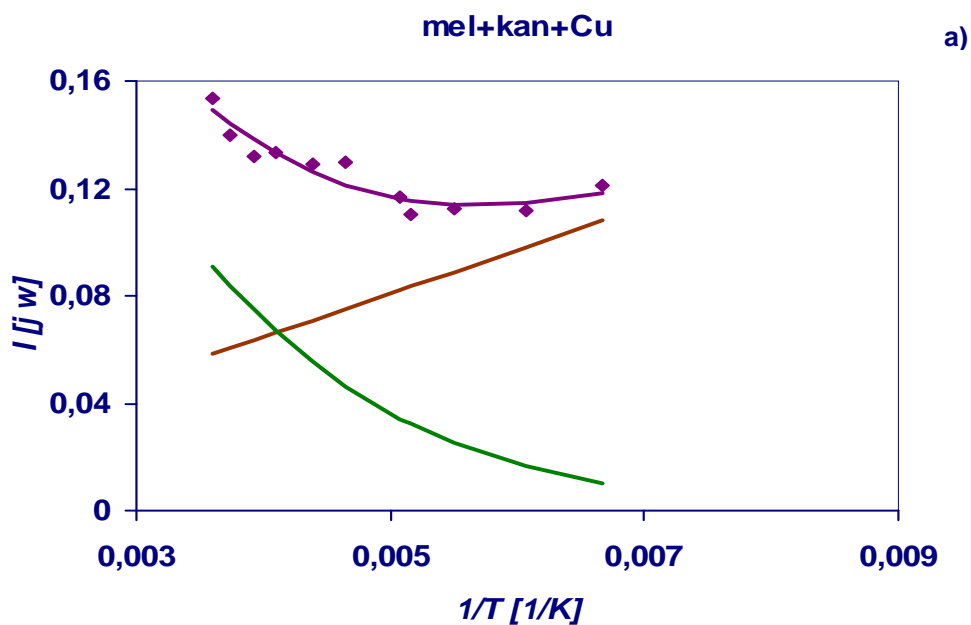
$$C = 9,1$$

b)

$$J/k = 125,6 \text{ K}$$

$$B = 415,4$$

$$C = 8,9$$



Rys. 71.

- a) Wykres zależności intensywności I od odwrotności temperatury pomiaru $1/T$ pomiaru dla kompleksu [(DOPA-melanina)-kanamycyna]-Cu(II)
- b) Wykres zależności iloczynu IT intensywności I oraz temperatury pomiaru T od odwrotności temperatury $1/T$ dla kompleksu [(DOPA-melanina)-kanamycyna]-Cu(II)

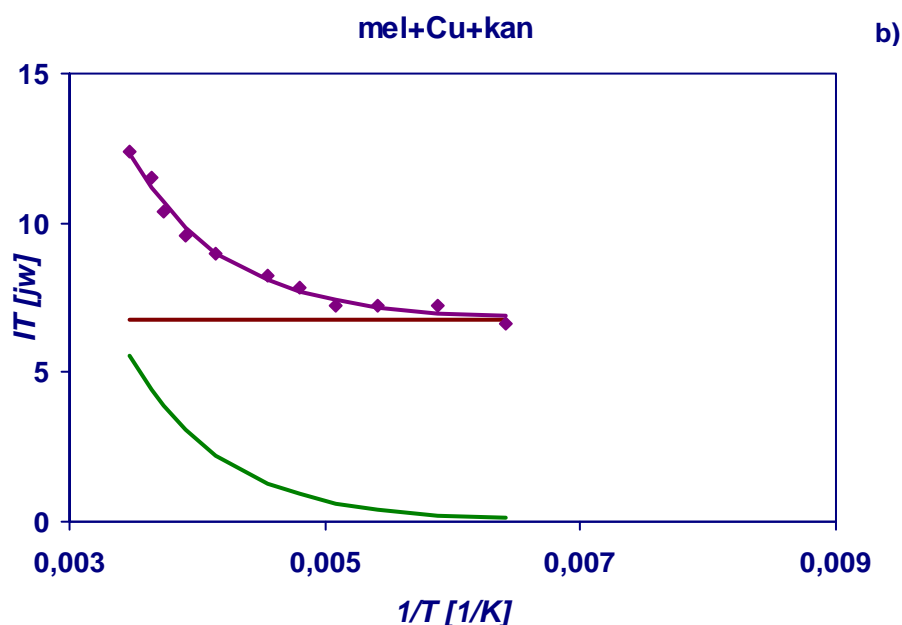
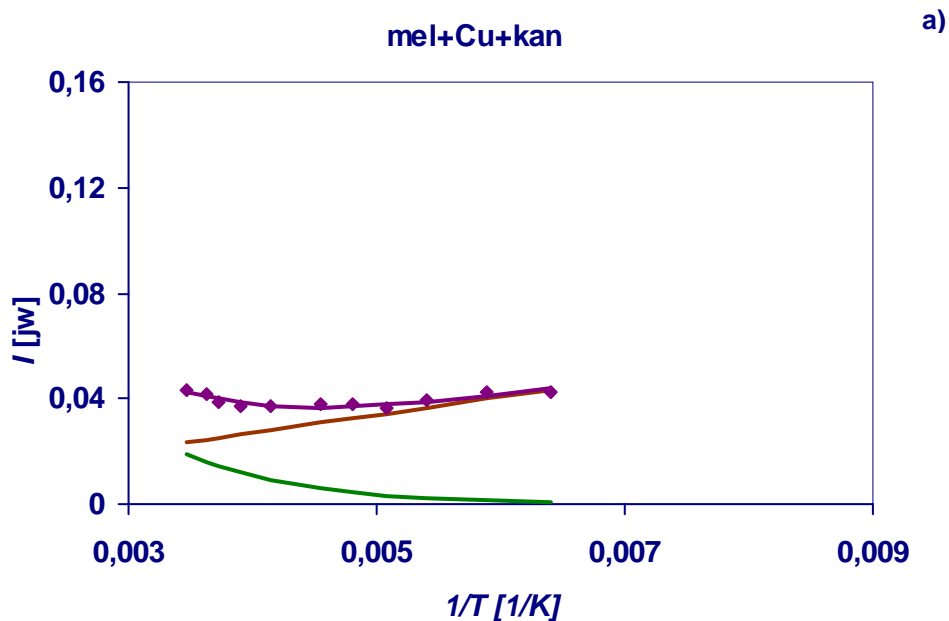
- punkty doświadczalne
- krzywa teoretyczna
- krzywa dla centrów paramagnetycznych o spinie $S = \frac{1}{2}$
- krzywa dla centrów paramagnetycznych termicznie wzbudzonych o spinie $S = 1$.

a)

$J/k = 94,2$ K
 $B = 824,4$
 $C = 16,2$

b)

$J/k = 94,2$ K
 $B = 822,9$
 $C = 16,2$



Rys. 72.

- a) Wykres zależności intensywności I od odwrotności temperatury pomiaru $1/T$ dla kompleksu [(DOPA-melanina)-Cu(II)]-kanamycyna
- b) Wykres zależności iloczynu IT intensywności I oraz temperatury pomiaru T od odwrotności temperatury $1/T$ dla kompleksu [(DOPA-melanina)-Cu(II)]-kanamycyna

- punkty doświadczalne
- krzywa teoretyczna
- krzywa dla centrów paramagnetycznych o spinie $S = \frac{1}{2}$
- krzywa dla centrów paramagnetycznych termicznie wzbudzonych o spinie $S = 1$.

a)

$J/k = 136,5$ K
 $B = 647,8$
 $C = 6,8$

b)

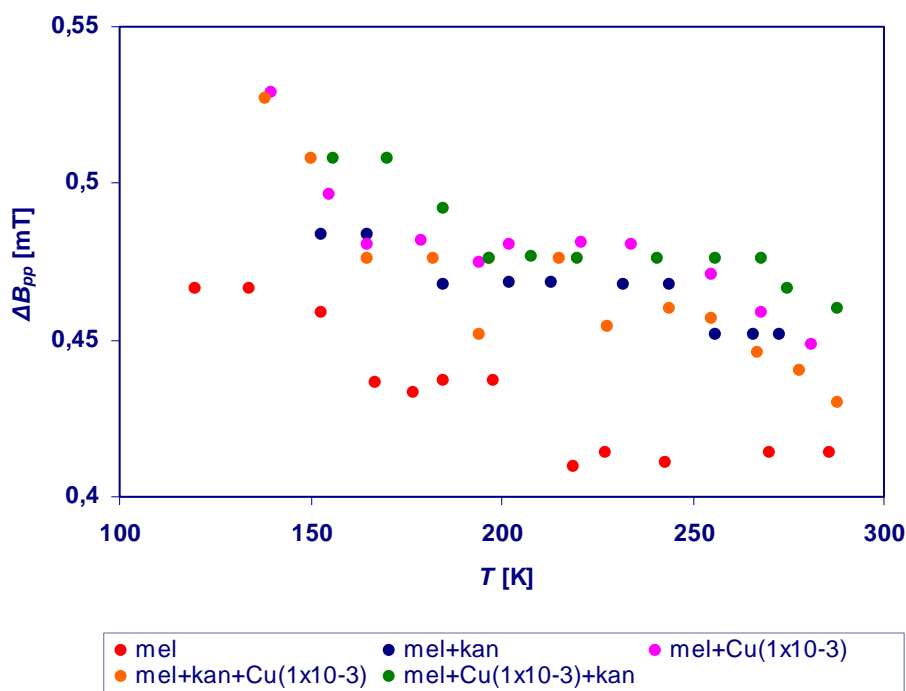
$J/k = 144,7$ K
 $B = 855,2$
 $C = 6,9$

Tabela 7. Stopień dopasowania modelu teoretycznego zakładającego jednoczesne istnienie centrów paramagnetycznych w stanie dubletowym ($S = \frac{1}{2}$) i w termicznie wzbudzonym stanie trypletowym ($S = 1$) do danych doświadczalnych

Próbka	Funkcja	Współczynnik determinacji R^2
(DOPA-melanina)	$I = f(T)$	0.977
	$I = f(1/T)$	
	$IT = f(T)$	0.999
	$IT = f(1/T)$	
(DOPA-melanina)-kanamycyna	$I = f(T)$	0.896
	$I = f(1/T)$	
	$IT = f(T)$	0.997
	$IT = f(1/T)$	
(DOPA-melanina)-Cu(II)	$I = f(T)$	0.894
	$I = f(1/T)$	
	$IT = f(T)$	0.923
	$IT = f(1/T)$	
[(DOPA-melanina)-kanamycyna]-Cu(II)	$I = f(T)$	0.943
	$I = f(1/T)$	
	$IT = f(T)$	0.992
	$IT = f(1/T)$	
[(DOPA-melanina)-Cu(II)]-kanamycyna	$I = f(T)$	0.915
	$I = f(1/T)$	
	$IT = f(T)$	0.994
	$IT = f(1/T)$	

Obliczone współczynniki były statystycznie istotne.

Rysunek 73 przedstawia wpływ temperatury pomiaru na szerokość linii sygnału EPR pochodzącego od wolnych rodników w melaninie.



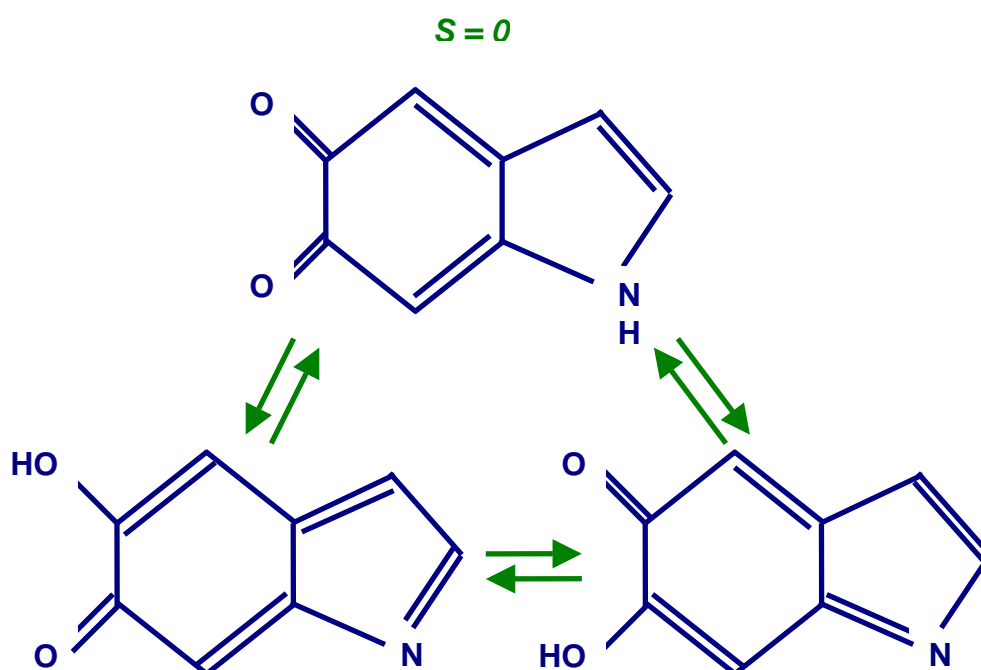
Rys. 73. Temperaturowa zależność szerokości widma EPR ΔB_{pp} DOPA-melaniny oraz jej kompleksów z kanamycyną i jonami miedzi(II). Stężenie jonów Cu(II) wynosiło 1×10^{-3} M.

Na podstawie temperaturowej zależności szerokości linii EPR badanych próbek można stwierdzić, czy przeważają w nich oddziaływania spin-sieć czy spin-spin. Czas relaksacji spin-sieć T_1 zależy od temperatury pomiaru [119]. Szerokość linii EPR uwarunkowana jest czasem relaksacji T_1 oraz T_2 . Otrzymana temperaturowa zależność szerokości linii EPR (rys. 73) wyraźnie wskazuje na przewagę oddziaływań spin-sieć.

4.4.2. Struktura chemiczna melaninowych centrów paramagnetycznych o spinie $S = 1$ oraz $S = \frac{1}{2}$

Dane uzyskane z przeprowadzonych pomiarów widm EPR w zakresie temperatur 100–300 K wykazały istnienie w badanych próbkach, oprócz centrów paramagnetycznych w stanie dubletowym o spinie $S = \frac{1}{2}$, centrów

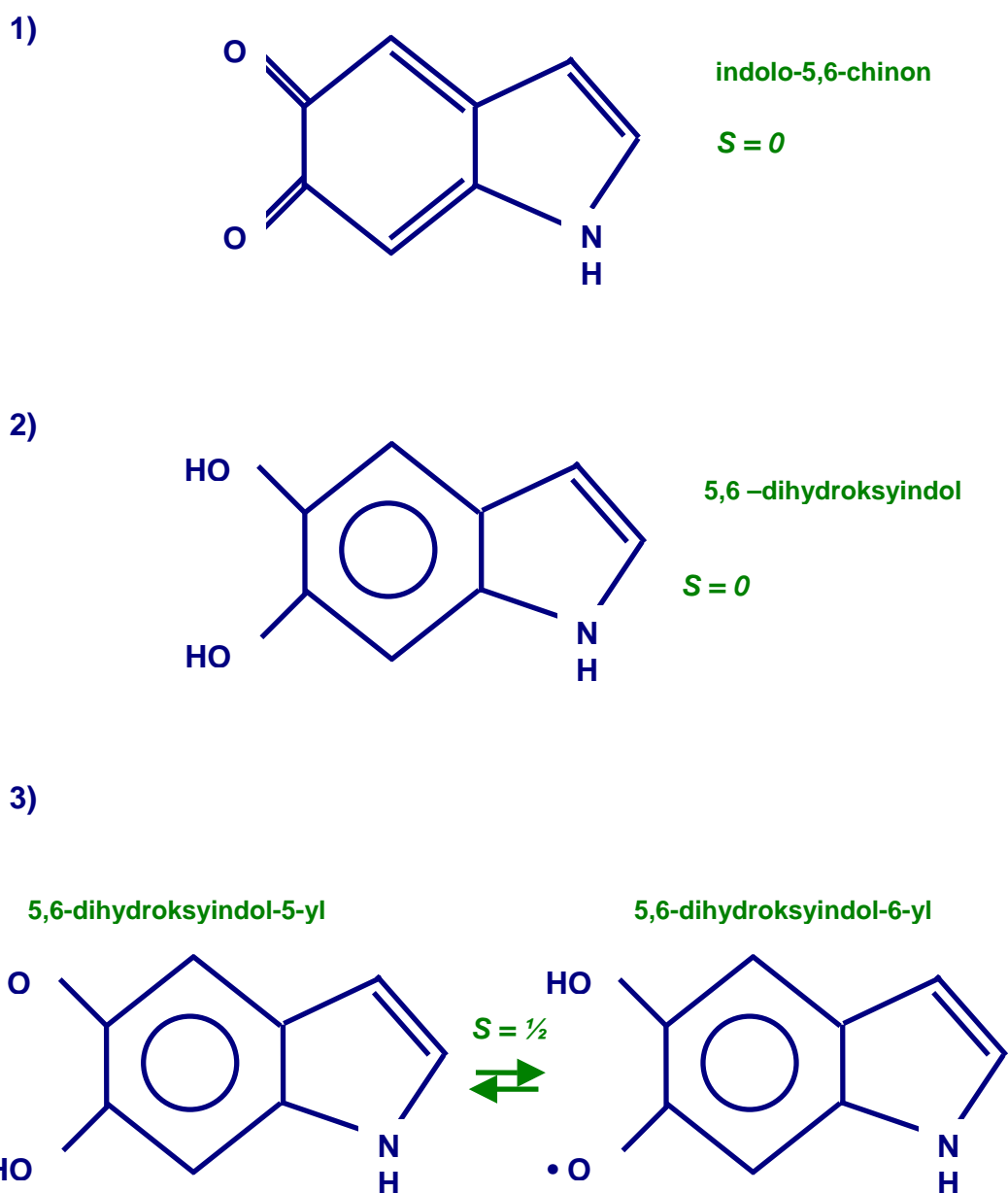
paramagnetycznych w termicznie wzbudzonym stanie trypletowym o spinie $S = 1$. Otrzymane wyniki pokazują, że prawo Curie $IT = C$ opisujące centra paramagnetyczne o spinie $S = \frac{1}{2}$ nie jest spełnione, co wskazuje na istnienie dodatkowego rodzaju centrów paramagnetycznych w badanych próbkach [129]. Rysunek 74 przedstawia tautomeryczne formy indolo-5,6-chinonu – podstawowej jednostki strukturalnej melaniny [140]. Tautomeria oznacza przemieszczenie atomu wodoru w obrębie molekuly i mówimy wtedy o formach tautomerycznych danego związku [141]. Skutkiem tych przejść jest różna możliwość zlokalizowania niesparowanych elektronów w molekule.



Rys.74. Struktury tautomeryczne indolo-5,6-chinonu wg [140]

Problem, jaki stwarza analiza jednostek chemicznych tworzących melaninę jest problemem bardzo rozległym [60, 72-79, 140]. Istnienie centrów paramagnetycznych w termicznie wzbudzonym stanie trypletowym ($S = 1$) nasunęło kolejne zadanie, a mianowicie wskazanie miejsc lokalizacji niesparowanych elektronów w strukturze DOPA-melaniny dających spin $S = 1$. Dyskusji poddano główny składnik tworzący polimer melaninowy – indolo-5,6-chinon. W melaninie mogą występować trzy formy jednostek indolochinonowych: 1) indolo-5,6-chinon ($S = 0$), 2) 5,6-dihydroksyindol ($S =$

0), 3) tautomeryczne struktury monorodnikowe: 5,6-dihydroksyindol-5-yl ($S = \frac{1}{2}$) i 5,6-dihydroksyindol-6-yl ($S = \frac{1}{2}$) [2, 140], które pokazano na rysunku 75.



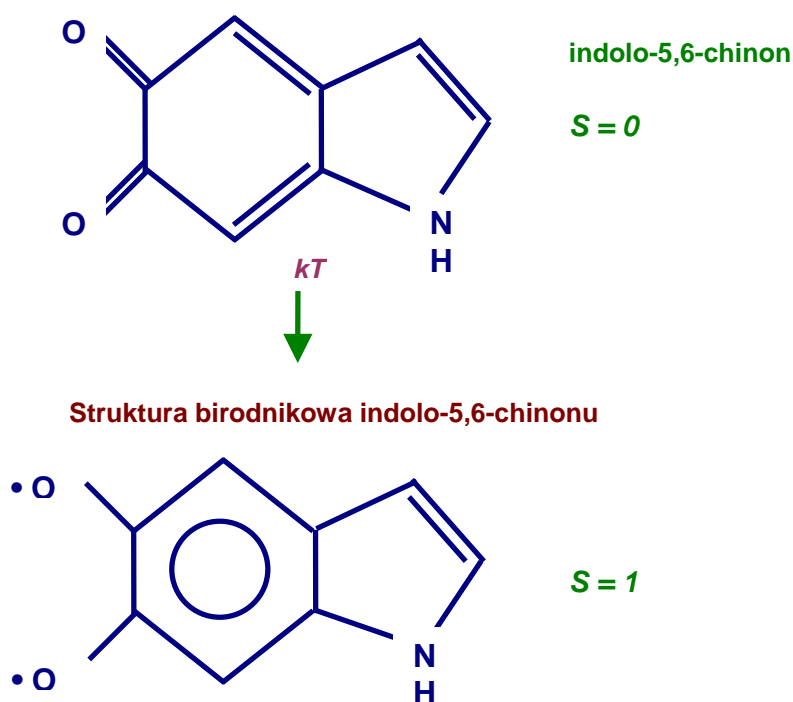
Tautomeryczne struktury monorodnikowe indolo-5,6-semichinonu

Rys. 75. Formy jednostek indolochinonowych występujące w melaninie: 1) indolo-5,6-chinon ($S = 0$), 2) 5,6-dihydroksyindol ($S = 0$), 3) tautomeryczne struktury monorodnikowe: 5,6-dihydroksyindol-5-yl ($S = \frac{1}{2}$) i 5,6-dihydroksyindol-6-yl ($S = \frac{1}{2}$) wg [2, 140]

W wyniku dostarczenia energii termicznej kT , wzbudzeniu do struktury o spinie $S = 1$ może ulec tylko forma chinonowa indolo-5,6-chinonu o spinie $S = 0$ według proponowanej reakcji przedstawionej na rysunku 76. Sygnał

EPR melaniny pochodzi więc od struktur birodnikowych o spinie $S = 1$ oraz od struktur monorodnikowych o spinie $S = \frac{1}{2}$.

Na występowanie w melaninie termicznie wzbudzonych stanów trypletowych o spinie $S = 1$ wskazują wyniki badań wpływu temperatury pomiaru na intensywność widm EPR badanych próbek dyskutowane w niniejszej pracy (rozdział 4.4.1). Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że takie pomiary dla analizowanych kompleksów DOPA-melaniny zostały przeprowadzone po raz pierwszy. Nowatorski charakter tych badań pozwala na lepsze zrozumienie natury centrów paramagnetycznych występujących w DOPA-melaninie oraz w jej kompleksach. W zależności od warunków pomiarów EPR mogą być obserwowane linie widmowe pochodzące od centrów paramagnetycznych będących w podstawowym stanie o spinie $S = \frac{1}{2}$ lub też można analizować widma EPR pochodzące od dwóch grup centrów paramagnetycznych posiadających spin $S = \frac{1}{2}$ oraz spin $S = 1$. Udowodnienie istnienia termicznie wzbudzonych stanów trypletowych pozwala również na bardziej wnikliwą analizę struktury polimeru melaninowego, która do tej pory nie jest jednoznacznie określona, o czym była już mowa wcześniej w niniejszej pracy.



Rys. 76. Struktura birodnikowa indolo-5,6-chinonu ($S = 1$) powstająca poprzez termiczne wzbudzenie indolo-5,6-chinonu ($S = 0$)

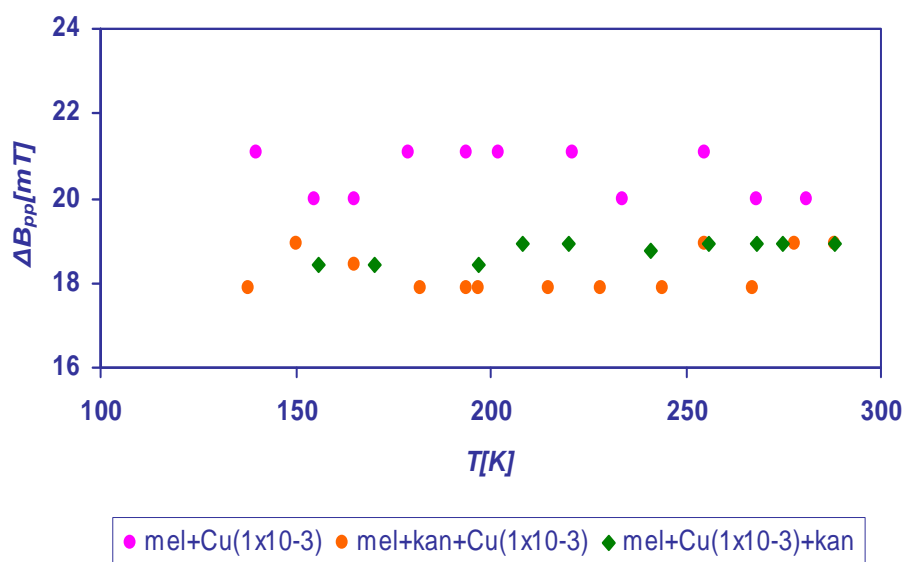
4.5. Wpływ temperatury pomiaru na widma EPR jonów miedzi(II) w badanych kompleksach DOPA-melaniny

W przypadku, gdy paramagnetyczne jony np. Cu(II) o spinie $S = \frac{1}{2}$ znajdują się bardzo blisko siebie, ich spiny mogą się dodawać i wtedy rozważane jest centrum paramagnetyczne o całkowitym spinie $S = 1$. Wzbudzenie do stanu trypletowego ($S = 1$) następuje w wyniku zbliżenia dwóch centrów paramagnetycznych o spinie $S = \frac{1}{2}$. Jeżeli istniałyby pary jonów miedzi(II) ze spinem całkowitym $S = 1$ lub agregaty czterocentowe ze spinem całkowitym $S = 2$, to widmo EPR powinno wykazywać złożoną strukturę nadsubtelną [142-144].

Wzbudzenie nie musi być spowodowane przejściami elektronów w obrębie poziomów energetycznych rozważanego atomu czy molekuly. W wyniku wzbudzenia może dojść do obniżenia całkowitego spinu a nie do jego wzrostu. Jako przykład można podać molekulę tlenu, której stanem podstawowym jest stan trypletowy. Stan singletowy uzyskuje wspomniana molekula w wyniku wzbudzenia. Tlen w stanie wzbudzonym posiada spin całkowity $S = 0$ [126].

Wprowadzone do polimeru melaninowego jony miedzi(II) charakteryzują się spinem $S = \frac{1}{2}$. Ponieważ z melaniną wiąże się niewielka ilość jonów miedzi(II) mało prawdopodobne wydaje się takie ich bliskie położenie, aby spiny sumowały się i w rezultacie dawały spin całkowity $S = 1$. Dlatego też nie przypuszcza się, aby jony miedzi(II) związane z melaniną mogły ulec wzbudzeniu do stanu trypletowego.

Podobnie jak w przypadku sygnału EPR pochodzącego od centrów paramagnetycznych melaniny, zbadano również wpływ temperatury pomiaru na szerokość sygnału EPR pochodzącego od jonów miedzi(II) (rys. 77). Nie zaobserwowano istotnego wpływu temperatury pomiaru na szerokość linii EPR. Szerokości linii różnią się między sobą biorąc pod uwagę kolejność kompleksowania. Największa szerokość linii jest charakterystyczna dla kompleksu DOPA-melaniny z jonami Cu(II). Wprowadzając lek jako pierwszy do polimeru melaninowego przed jonami miedzi(II) otrzymuje się największy spadek szerokości linii (rys. 77).



Rys. 77. Temperaturowa zależność szerokości ΔB_{pp} widma EPR jonów miedzi(II) . Stężenie jonów Cu(II) wynosiło 1×10^{-3} M.

Na podstawie otrzymanej temperaturowej zależności szerokości widma EPR jonów Cu(II) badanych próbek można powiedzieć, że przeważają w nich oddziaływania spin-spin. Czas relaksacji spin-spin wykazuje małą zależność od temperatury pomiaru [119].

5. WNIOSKI

1. Stwierdzono wpływ kanamycyny i jonów miedzi(II) na koncentrację wolnorodnikowych centrów paramagnetycznych w DOPA-melaninie. Kanamycyna powoduje wzrost, natomiast jony miedzi(II) powodują spadek koncentracji centrów paramagnetycznych.

Zaobserwowano spadek koncentracji wolnorodnikowych centrów paramagnetycznych w melaninie wraz ze wzrostem stężenia jonów miedzi(II).

Obniżenie koncentracji centrów paramagnetycznych w melaninie spowodowane obecnością jonów miedzi(II) wskazuje na udział rodników melaninowych w wiązaniu metalu do polimeru.

2. Wyniki uzyskane metodą EPR potwierdzają zjawisko blokowania miejsc wiążących w strukturze polimeru melaninowego przez kanamycynę lub jony miedzi(II) w zależności od kolejności ich wprowadzania.

Koncentracje wolnych rodników w kompleksach [(DOPA-melanina)-kanamycyna]-Cu(II) są wyższe niż w kompleksach [(DOPA-melanina)-Cu(II)]-kanamycyna.

3. Na podstawie otrzymanych współczynników rozszczepienia spektroskopowego g dla widm EPR jonów miedzi(II), przedstawiono propozycje otoczenia kwadratowego jonów Cu(II) w melaninie.

4. Analiza wpływu mocy mikrofalowej na sygnał EPR badanych próbek wykazała występowanie odpowiednio wolnych i szybkich procesów relaksacji spin-sieć w układzie wolnorodnikowych i miedziowych centrów paramagnetycznych w DOPA-melaninie.

Zjawisko nasycenia mikrofalowego linii EPR jest obserwowane dla wolnorodnikowych centrów paramagnetycznych występujących w melaninie. Zjawisko to nie występuje w badanym zakresie mocy mikrofalowych (0,7-70 mW) w przypadku sygnału EPR pochodzącego od jonów miedzi(II).

5. Udowodniono istnienie termicznie wzbudzonych stanów trypletowych ($S = 1$) w DOPA-melaninie oraz w kompleksach DOPA-melaniny z kanamycyną i jonami Cu(II).

Badania zależności temperaturowej intensywności sygnału EPR melaniny oraz badanych kompleksów wykazały istnienie dwóch składników widma EPR, z których jeden spełnia prawo Curie i odpowiada centrom paramagnetycznym w stanie dubletowym ze spinem $S = \frac{1}{2}$, a drugi nie spełnia prawa Curie i odpowiada centrom paramagnetycznym w termicznie wzbudzonym stanie trypletowym ze spinem $S = 1$.

Energie wzbudzenia singlet-tryplet J/k dla analizowanych próbek melaninowych są z zakresu 76,1–145,4 K.

6. Zaproponowano strukturę chemiczną termicznie wzbudzonych centrów paramagnetycznych o spinie $S = 1$ występujących w DOPA-melaninie.

6. LITERATURA

- [1] K. Wakamatsu, S. Ito, Advanced chemical methods in melanin determination, *Pigment Cell Res.* **15**, 174-183 (2002)
- [2] T. Sarna, Badanie struktury i właściwości centrów aktywnych melanin, *Zagad. Biofiz. Współ.*, **6**, 210-219 (1981)
- [3] T. Sarna, Fotobiofizyczne właściwości melanin i reakcje upigmentowanych komórek na światło, *Zagad. Biofiz. Współ.*, **12**, 119-132 (1987)
- [4] M. R. Chedekel, Photophysics and photochemistry of melanin. Melanin: its role human photoprotection, Valdenmar Publishing Co, Overland Park (1995)
- [5] J. D. Simon, Y. Liu, J. B. Nofsinger, Assembly and aerobic photoreactivity of melanin, *The Spectrum*, **15** (1), 1-16 (Spring 2002)
- [6] P. R. Williamson, Lacasse and melanin in the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*, *Front. Biosci.*, **2**, 99-107 (1997)
- [7] L. Liu, K. Wakamatsu, S. Ito, P. R. Williamson, Catecholamine oxidative products, but not melanin, are produced by *Cryptococcus neoformans* during neuropathogenesis in mice, *Infect. Immunity*, **67** (9), 108-112 (1999)
- [8] P. R. Williamson, K. Wakamatsu, S. Ito, Melanin biosynthesis in *Cryptococcus neoformans*, *J. Bacteriol.*, **180** (6), 1570-1572 (1998)
- [9] J. D. Nosanchuck, A. L. Rosas, A. Casadeval, The antibody response to fungal melanin in mice, *J. Immunol.*, **160**, 6026-6031 (1998)
- [10] E. Buszman, A. Wiewióra, B. Bilińska, Struktura biopolimerów melaninowych z włosów ludzkich. Badania techniką spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego, *Post. Fiz. Med.*, **26**, 81-86 (1991)
- [11] E. Buszman, M. Latocha, W. Namysłowski, B. Pilawa, T. Wilczok, Effect of Cd^{2+} , Zn^{2+} i Cu^{2+} ions on proliferation and melanization of mouse melanoma cells, *Ann. Acad. Med. Siles.*, **34-35**, 11-27 (1998)
- [12] B. C. Cope, L. Hopegood, J. Latham, R. G. Linford, J. D. Reilly, M. C. R. Symons, F. A. Taiwo, Studies of equid hoof horn material by EPR spectroscopy, *J. Mater. Chem.*, **8** (1), 43-45 (1998)
- [13] M. R. Okun, B. Donnellan, S. H. Pearson, L. M. Edelstein, Melanin: A normal component of human eosinophils, *Lab. Invest.*, **30**, 681-685 (1974)

- [14] B. S. Larson, Interaction between chemicals and melanin, *Pigment Cell Res.*, **6**, 127-133 (1993)
- [15] R. A. Nicolaus, *Melanins*, Ed. E. Lederer, Hermann, Paris (1968)
- [16] I. A. Menon, E. V. Gan, H. F. Haberman, Electron transfer properties of melanin and melanoproteins, in: *Pigment Cell*, **3**, 69-81, Ed. V. Piley, Seattle (1976)
- [17] E. Buszman, Wiązanie substancji leczniczych do biopolimerów melaninowych w obecności jonów metali, Rozprawa habilitacyjna, Śląska Akademia Medyczna, Katowice, 1994
- [18] A. C. J. Burgers, Biological aspects of pigment cells research. In: *Structure and control of the melanocyte*. Ed. G. Della-Porta, O. Mühlbock, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 6-16 (1966)
- [19] P. Shizgal, A. Arvanitogiannis, Gambling on Dopamine, *Science*, **299** (5614), 1856-1858 (2003)
- [20] G. Karpińska, A. Stańczak, A. P. Mazurek, Współczesne poglądy na temat struktury, właściwości i funkcji melanin, *Wiad. Chem.*, **45**, 169-175 (1991)
- [21] L. Zecca, D. Tampellini, M. Gerlach, P. Riederer, R. G. Fariello, D. Sulzer, Substantia nigra neuromelanin: structure, synthesis, and molecular behaviour, *J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol.*, **54**, 414-418 (2001)
- [22] M. G. Bridelli, D. Tampellini, L. Zecca, The structure of neuromelanin and its iron binding site studied by infrared spectroscopy, *FEBS Letters*, **457**, 18-22 (1999)
- [23] T. Shima, T. Sarna, H. M. Swartz, A. Stroppolo, R. Gerbasi, L. Zecca, Binding of iron to neuromelanin of human *substantia nigra* and synthetic melanin: an electron paramagnetic resonance spectroscopy study, *Free Rad. Biol. Med.*, **23** (1), 110-119 (1997)
- [24] F. Bolzoni, S. Giraud, L. Lopiano, B. Bergamasco, P. R. Crippa, Magnetic investigation of human mesencephalic neuromelanin, *Biochem. Biophys. Acta*, **1586**, 210-218 (2002)
- [25] G. Prota, Some new aspects of eumelanin chemistry, *Prog. Clin. Biol. Res.*, **256**, 101-124 (1988)
- [26] S. Łukiewicz, K. Reszka, Z. Matuszak, Simultaneous electrochemical-electron spin resonance (SEESR) studies on natural and synthetic melanins, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **7**, 153-165 (1980)

- [27] M. Jastrzębska, T. Wilczok, Thermoelectric effect in synthetic DOPA-melanins, *Stud. Biophys.*, **122**, 39-46 (1987)
- [28] Z. Filip, K. Haider, H. Beutelspacher, J. P. Martin, Comparison of IR-spectra from melanins of microscopic soil fungi, humic acids and model phenol polymers, *Geoderma*, **11**, 37-52 (1974)
- [29] J. P. Ortonne, The effects of ultraviolet exposure on skin melanin pigmentation, *J. Int. Med. Res.*, **18** (3), 8C-17C (1990)
- [30] D. Wrześniok, E. Buszman, J. Trzcionka, R. Różańska, Wiązanie streptomycyny i dihydrostreptomycyny do melaniny w aspekcie ototoksycznego działania aminoglikozydów, *Ann. Acad. Med. Siles*, **40**, 63-76 (1999)
- [31] K. Stępień, Melanina jako biopolimer wiążący substancje lecznicze, *Acta Pol. Pharm.*, **45** (5), 435-440 (1988)
- [32] C. C. Felix, J. S. Hyde, T. Sarna, R. C. Sealy, Interaction of melanin with metal ions. Electron spin resonance evidence for chelate complexes of metal ions with free radicals, *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 3922-3926 (1978)
- [33] P. J. Farmer, S. Gidianian, T. McIntire, C. Moore, Structural investigation of DHI-melanin aggregates, Abs. 1196, 204th Meeting, The Electrochemical Society, Inc. (2003)
- [34] A. Dzierżęga-Lęcznar, B. Pilawa, K. Stępień, T. Wilczok, Struktura nadsubtelna widm EPR syntetycznych feomelanin, *Materiały XXIX Ogólnopolskiego Seminarium na Temat Magnetycznego Rezonansu Jądrowego i jego Zastosowań*, Kraków (1997), 373-376
- [35] E. J. Land, P. A. Riley, Spontaneous redox reactions of dopaquinone and the balance between the eumelanin and phaeomelanin pathways, *Pigment Cell Res.*, **13**, 273-277 (2000)
- [36] S. Ito, Reexamination of the structure of eumelanin, *Biochem. Biophys. Acta*, **883**, 155-161 (1986)
- [37] S. S. Chio, J. S. Hyde, R. C. Sealy, Paramagnetism in melanins: pH dependence, *Archiv. Biochem. Biophys.*, **215** (1), 100-106 (1982)
- [38] S. S. Chio, J. S. Hyde, R. C. Sealy, Temperature-dependence paramagnetism in melanin polymers, *Archiv. Biochem. Biophys.*, **199** (1), 133-139 (1980)
- [39] E. Chodurek, B. Pilawa, A. Dzierżęga-Lęcznar, S. Kurkiewicz, L. Świątkowska, T. Wilczok, Effect of Cu²⁺ and Zn²⁺ ions on DOPA-melanin

structure as analyzed by pyrolysis-gas chromatography-mass spectroscopy and EPR spectroscopy, *J. Anal. Appl. Pyrol.*, **70**, 43-54 (2003)

[40] U. Mars, B. S. Larsson, Pheomelanin as a binding site for drugs and chemicals, *Pigment Cell Res.*, **12**, 266-274 (1999)

[41] B. Larson, H. Tjavle, Studies on the mechanism of drug-binding to melanin., *Biochem. Pharmacol.*, **28**, 1181-1187 (1979)

[42] K. B. Stępień, J. P. Dworzański, S. Imielski, T. Wilczok, Study of chloroquine binding to melanins by pyrolysis-gas chromatography and electron spin resonance spectroscopy, *J. Anal. Appl. Pyrol.*, **9**, 297-307 (1986)

[43] D. Wrześniok, E. Buszman, E. Karna, P. Nawrat, J. Pałka, Melanin potentiates gentamicin-induced inhibition of collagen biosynthesis in human skin fibroblast, *European J. Pharmacol.*, **446**, 7-13 (2002)

[44] H. Ibrahim, A. F. Aubry, Development of a melanin-based high-performance liquid chromatography stationary phase and its use in the study of drug-melanin binding interactions, *Anal. Bioch.*, **229**, 272-277 (1995)

[45] A. W. Tepper, L. Bubacco, G. W. Canters, Structural basis and mechanism of the inhibition of the type-3 copper protein tyrosinase from *Streptomyces antibioticus* by halide ions, *J. Biol. Chem.*, **277** (34), 30436-30444 (2002)

[46] J. G. Hardman, L. E. Limbird, P. B. Molinof, The pharmacological basis of therapeutics, The McGraw-Hill Companies Inc. (1996)

[47] L. Garrod, H. Lambert, F. O'Grady, *Antybiotyko- i Chemioterapia*, PZWL, Warszawa 1983

[48] A. A. Chiodo, P. W. Abberti, Experimental, clinical and preventive aspects of ototoxicity, *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, **251**, 375-392 (1994)

[49] J. Marais, J. A. Rutka, Ototoxicity and topical eardrops, *Clin. Otolaryngol.*, **23**, 360-367 (1998)

[50] B. Pilawa, M. Latocha, E. Buszman, T. Wilczok, Effect of oxygen on spin-spin and spin-lattice relaxation in DOPA-melanin complexes with chloroquine and metal ions, *Appl. Magn. Reson.*, **25**, 105-111 (2003)

[51] E. Buszman, B. Pilawa, M. Zdybel, D. Wrześniok, A. Grzegorzczuk, T. Wilczok, EPR examination of Zn²⁺ and Cu²⁺ effect on free radicals in DOPA-melanin-netilmicin complexes, *Chem. Phys. Lett.*, **403**, 22-28 (2005)

- [52] W. Froncisz, T. Sarna, J. S. Hyde, Cu²⁺ Probe of metal-ion binding sites in melanin using electron paramagnetic resonance, *Archiv. Biochem. Biophys.*, **202** (1), 289-303 (1980)
- [53] M. Pasenkiewicz-Gierula, W. Korytowski, J. Gierula, Oddziaływanie melaniny z jonami metali przejściowych, *Zeszyty Naukowe UJ, Prace z Biologii Molekularnej*, **11**, 111-118 (1985)
- [54] N. Senesi, G. Sposito, J. P. Martin, Copper(II) and iron(III) complexation by human acid-like polymers (melanin) from soil fungi, *Sci. Total Environ.*, **62**, 241-252 (1987)
- [55] B. Szpoganicz, S. Gidanin, P. Kong, P. Farmer, Metal binding by melanins: studies of colloidal dihydroxyindole-melanin, and its complexation by Cu(II) and Zn(II) ions, *J. Inorg. Biochem.*, **89**, 45-53 (2002)
- [56] M. J. Hoogduijn, N. P. Smit, A. Van der Laarse, A. F. Van Nieuwpoort, J. M. Wood, A. J. Thody, Melanin has a role in Ca²⁺ homeostasis in human melanocytes, *Pigment Cell Res.*, **16**, 127-132 (2003)
- [57] A. Lyden, B. S. Larson, N. G. Lindquist, Melanin affinity of manganese, *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **55**, 133-138 (1984)
- [58] S. A. Z. Senior, L. L. Mans, H. D. VanGuilder, K. A. Kelly, M. P. Hendrich, T. E. Elgren, Catecholase activity associated with copper-S100B, *Biochemistry*, **42**, 4392-4397 (2003)
- [59] M. Matuszczyk, E. Buszman, B. Pilawa, T. Witoszyńska, T. Wilczok, Cd²⁺ effect on free radicals in *Cladosporium cladosporioides*-melanin tested by EPR spectroscopy, *Chem. Phys. Lett.*, **394**, 366-371 (2004)
- [60] E. Chodurek, Ocena wpływu jonów miedzi na strukturę biopolimerów melaninowych techniką Py-GC-MS, Praca doktorska, Śląska Akademia Medyczna (1997)
- [61] P. J. Farmer, S. Gianian, B. Shanadeh, A. J. Di Bilio, N. Tohidian, F. L. Meyskens Jr, Melanin as a target for melanoma chemotherapy: Pro-oxidant effect of oxygen and metals on melanoma viability, *Pigment Cell Res.*, **16**, 273-279 (2003)
- [62] W. Korytowski, Jonowymienne właściwości melanin – oddziaływanie z jonami metali, *Zesz. Nauk. UJ, Prace z Biologii Molekularnej*, **9**, 279-283 (1982)

- [63] A. Gergely, T. Kiss, Complexes of 3,4-dihydroxyphenyl derivatives. Copper(II) complexes of DL-3,4-dihydroxyphenylalanine, *Inorg. Chim. Acta*, **16**, 51-59 (1976)
- [64] L. Bardani, M. G. Bridelli, M. Carbuticchio, P. R. Crippa, Comparative Mossbauer and infrared analysis of iron-containing melanin, *Biochem. Biophys. Acta*, **716**, 8-15 (1982)
- [65] D. Sulzer, J. Bogulavsky, K. A. Larsen, G. Behr, E. Karatekin, M. H. Kleinman, N. Turro, D. Krantz, R. H. Edwards, I. A. Greene, L. Zecca, Neuromelanin biosynthesis is driven by excess cytosolic catecholamines not accumulated by synaptic vesicles, *PNAS*, **97** (22), 11869-11874 (2000)
- [66] N. N. Zdhanova, A. I. Vasilevskaia., *Melaninsoderzhashchie griby v ekstremalnykh usloviakh*, Ed. Naukova Dumka, Kiev, 137-172 (1988)
- [67] B. Pilawa, E. Buszman, M. Latocha, T. Wilczok, EPR studies of melanin from *Cladosporium cladosporioides*, *Polish J. Med. Phys. & Eng.*, **2** (3), 59-65 (1996)
- [68] E. Buszman, B. Pilawa, M. Latocha, T. Wilczok, D. Tyrawska-Spychałowa, C. Bajan, A. Bijak, B. Bilińska, Spectroscopic study of melanins isolated from pigmented soil fungi of the Karkonosze Mountains, *Curr. Top. Biophys.*, **22** (1), 21-24 (1998)
- [69] B. Pilawa, E. Buszman, A. Gondzik, S. Wilczyński, M. Zdybel, T. Wituszyńska, T. Wilczok, Effect of pH on paramagnetic center in *Cladosporium cladosporioides*, *Acta Phys. Polon. A*, **108** (1), 147-150 (2005)
- [70] M. J. Bulter, A. W. Day, Fungal melanins: a review, *Can. J. Microbiol.*, **44**, 1115-1136 (1998)
- [71] W. Korytowski, T. Sarna, Bleaching of melanin pigments, *J. Biolog. Chem.*, **265** (21), 12410-12416 (1990)
- [72] G. A. Swan, A. Waggot, Studies related to the chemistry of melanins. Part X. Quantitative assessment of different types of units presents in dopa-melanin, *J. Chem. Soc.*, 1409-1418 (1970)
- [73] A. Dzierżęga-Lęcznar, K. Stępień, E. Chodurek, S. Kurkiewicz, L. Świątkowska, T. Wilczok, Pyrolysis-gas chromatography/mass spectroscopy of peroxy-nitrite-treated melanins, *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, **70**, 457-467 (2003)
- [74] M. Latocha, E. Chodurek, S. Kurkiewicz, L. Świątkowska, Pyrolytic GC-MS analysis of melanin from black, gray and yellow strains of *Drosophila melanogaster*, *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, **56**, 89-98 (2000)

- [75] A. Dzierżęga-Lęcznar, E. Chodurek, K. Stępień, T. Wilczok, Pyrolysis-gas chromatography of synthetic neuromelanins, *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, **62**, 239-248 (2002)
- [76] E. Chodurek, M. Latocha, S. Kurkiewicz, E. Buszman, L. Świątkowska, T. Wilczok, Chemical characteristics of melanin from *Cladosporium cladosporioides*, *Bulletin of The Polish Academy of Sciences, Biol. Scien.*, **46** (2), 51-58 (1998)
- [77] S. Ito, Advances in chemical analysis of melanins, p. 439-450. *In*: J. J. Nordlund, R. E. Boissy, V. J. Hearing, R. A. King, and J. P. Ortonne (ed.), *The pigmentary system: physiology and pathophysiology*. Oxford University Press, New York, N. Y. (1986)
- [78] www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/d20/20d.htm
- [79] O. van der Most, "Ganz schön Haarig!", <http://www.chemie.uni-marburg.de/~butenuth/644/Haardateien/Eigenschaften3.htm>
- [80] *Handbook of Chemistry and Physics, Forty-Ninth Edition*, Editor Robert C. Weast, The Chemical Rubber Co, Cleveland, Ohio, (1968), p. C-376
- [81] B. Pilawa, E. Buszman, D. Wrześniok, M. Latocha, T. Wilczok, Application of EPR spectroscopy to examination of gentamicin and kanamycin binding to DOPA-melanin, *Appl. Magn. Reson.*, **23**, 181-192 (2002)
- [82] E. Buszman, B. Pilawa, T. Witoszyńska, M. Latocha, T. Wilczok, Effect of Zn^{2+} and Cu^{2+} on free radical properties of melanin from *Cladosporium cladosporioides*, *Appl. Magn. Reson.*, **24**, 401-407 (2003)
- [83] B. Pilawa, E. Chodurek, T. Wilczok, Types of paramagnetic centers in Cu^{2+} complexes with model neuromelanins, *Appl. Magn. Reson.*, **24**, 417-422 (2003)
- [84] R. C. Sealy, J. S. Hyde, C. C. Felix, I. A. Menon, G. Prota, Eumelanins and pheomelanins: characterization by electron spin resonance spectroscopy, *Science*, **217**, 545-547 (1982)
- [85] P. G. Pascutti, A. S. Ito, EPR study of melanin-protein interaction: photoinduced free radicals and progressive microwave power saturation, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **16**, 257-266 (1992)
- [86] R. C. Sealy, W. Puzyna, B. Kalynaraman, C. C. Felix, Identification by electron spin resonance spectroscopy of free radicals produced during autoxidative melanogenesis, *Biochem. Biophys. Acta*, **800**, 269-276 (1984)

- [87] J. Stainsack, A. S. Mangrich, C. M. B. F. Maia, V. G. Machado, J. C. P. dos. Santos, S. Nakagaki, Spectroscopic investigation of hard and soft metal binding sites in synthetic melanin, *Inorg. Chim. Acta*, **356**, 243-248 (2003)
- [88] C. C. Felix, J. S. Hyde, T. Sarna, Interaction of melanin with metal ions. Electron spin resonance evidence for chelate complexes of metal ions with free radicals, *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 3922-3926 (1978)
- [89] T. Sarna, C. Mailer, J. S. Hyde, H. M. Swartz, B. M. Hoffman, Electron-nuclear double resonance in melanins, *Biophys. J.*, **16**, 1165-1170 (1976)
- [90] S. Ito, K. Fujita, Microanalysis of eumelanin and pheomelanin in hair and melanomas by chemical degradation and liquid chromatography, *Anal. Biochem.*, **144**, 527-536 (1985)
- [91] A. Pazella, A. Napolitano, M. d'Ischia, G. Prota, Oxidative polymerization of 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid to melanin: A new insight. *Tetrahedron*, **52** (23), 7913-7920 (1996)
- [92] H. Ozeki, S. Ito, T. Wakamatsu, Chemical characterization of melanins in sheep wool and human hair, *Pigment Cell Res.*, **9**, 51-57 (1996)
- [93] S. Ito, High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Analysis of eu- and pheomelanin in melanogenesis control, *J. Invest. Dermatol.*, **100**, 166-171 (1993)
- [94] F. Bouvier, O. Dogbo, B. Camera, Biosynthesis of the food and cosmetics plant pigments bixin (Annatto), *Science*, **300** (5628), 2089-2091 (2003)
- [95] T. Mikulski, Widma elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) oraz w podczerwieni melaniny oczu i barwnika z *substantia nigra*, *Acta Physiol. Pol.*, **21** (20), 219-225 (1970)
- [96] B. Bilińska, U. Kolczyńska, T. Wilczok, Infrared studies of melanin-iron complexes, *Stud. Biophys.*, **122**, 157-163 (1987)
- [97] B. Bilińska, On the structure of human hairs melanins from an infrared spectroscopy analysis of their interactions with Cu^{2+} ions., *Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectrosc.*, **57** (12), 2525-2533 (2001)
- [98] A. Menon, S. Persad, H. F. Haberman, and C. J. Kurjan, A comparative study of the physical and chemical properties of melanins isolated from human black and red hair, *J. Invest. Dermatol.*, **80** (3), 202-206 (1983)

- [99] Z. Filip, K. Haider, H. Beutelspacher and J. P. Martin, Comparisons of IR-spectra from melanins of microscopic soil fungi, humic acids and model phenol polymers, *Geoderma*, **11**, 37-52 (1974)
- [100] D. L. Williams-Smith, L.J. Dunne, S. Evans, L. G. Pritchard, E. L. Evans, X-ray photoelectron spectroscopy and the structure of melanins, *FEBS Letters*, **69**, 291-294 (1976)
- [101] T. Wilczok, K. Stępień, E. Buszman, J. Dworzański, B. Bilińska, Z. Dzierżewicz, D. Vucelić, V. Vucelić, B. Simonović, J. Hranisavljević, Modern trends in the analysis of melanin structure and function, *Stud. Biophys.*, **122**, 11-21 (1987)
- [102] J. K. Podlewski, A. Chwalibogowska-Podlewska, *Leki współczesnej terapii 2001/2002*, Wydawnictwa Fundacji Buchnera, Warszawa 2001, str. 343
- [103] A. Zajęc, M. Gorczyca, *Chemia leków*, PZWL, Warszawa (1998)
- [104] J. Marais, J. A. Rutka, Ototoxicity and topical eardrops, *Clin. Otolaryngol.*, **23**, 360-367 (1998)
- [105] P. J. Goaverts, J. Claes, P. H. Van De Heyning, Ph. G. Jorens, J. Marquet, M. E. De Broe, Aminoglycosyde – induced ototoxicity, *Toxicol. Lett.*, **52**, 227-252 (1990)
- [106] A. Forge, J. Schacht, Aminoglycosyde antibiotics, *Audiol. Neurootol.* **5**, 3-22 (2000)
- [107] Toksykologia, pod redakcją W. Seńczuka, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1994, str. 330-332
- [108] Y. Ohba, M. Nishimura, N. Mizuochi, S. Yamauchi, Structures and electronic states of photoexcited states in a system of two nitroxide radicals linked to fullerene studied by two-dimensional pulsed nutation and time-resolved electron paramagnetic resonance spectroscopy, *Appl. Magn. Reson.*, **26** (1-2), 117-134 (2004)
- [109] K. M. Salikhov, Mechanism of the electron spin polarization of excited triplet states caused by the mutual annihilation of triplet states, *Appl. Magn. Reson.*, **26** (1-2), 135-144 (2004)
- [110] S. Tero-Kubota, K. Zikihara, T. Yago, Y. Kobori, K. Akiyama, Control of the sign of exchange interactions in solvent-separated radical ion pairs, *Appl. Magn. Reson.*, **26** (1-2), 145-154 (2004)

- [111] A. Kawai, FT-EPR Study on the sign of exchange interactions in triplet naphthalene-galvinoxyl encounter pair, *Appl. Magn. Reson.*, **26** (1-2), 213-221 (2004)
- [112] A. I. Kokorin, Regularities of the spin exchange coupling through a bridge in nitroxide biradicals, *Appl. Magn. Reson.*, **26** (1-2), 253-274 (2004)
- [113] S. Tero-Kubota, Singlet and triplet energy splitting in radical ion pairs generated by photoinduced electron-transfer reactions, *Pure Appl. Chem.*, **73** (3), 519-523 (2001)
- [114] A. B. Więckowski, B. Pilawa, L. Świątkowska, W. Wojtowicz, G. P. Słowik, M. Lewandowski, Thermally excited multiplet states in macerals separated from bituminous coal, *J. Magn. Reson.*, **145**, 62-72 (2000)
- [115] B. Pilawa, M. Latocha, R. Krzyminiewski, Z. Kruczyński, E. Buszman, T. Wilczok, Effect of temperature on melanin EPR spectra, *Phys. Med.*, vol. XX, Suppl. 1, 96-98 (2004)
- [116] F. Binns, R. F. Chapman, N. C. Robson, G. A. Swan, A. Waggot, Studies related to the chemistry of melanins. Part VIII. The pyrrolecarboxylic acid formed by oxidations or hydrolysis of eumelanin derived from 3,4-dihydroxyphenethylamine or 3,4-dihydroxyphenylalanine, *J. Chem. Soc.*, 1128-1134 (1970)
- [117] M. Rizk, F. Younis, Spectrofotometric assay of certain aminoglycoside antibiotics using chloranil, *Anal. Lett.*, **17**, 1803-1809 (1984)
- [118] J. E. Wertz, J. R. Bolton, *Electron Spin Resonance, Elementary theory and practical applications*, McGraw-Hill Book Company, New York (1986), p. 456-457
- [119] A. Więckowski, Matematyczna analiza kształtu linii EPR zwężonej wymiennie, W: *Prace Komisji Matematyczno-Przyrodniczej - Fiz. Diel. Radiospek.*, **7** (1), 101—119 (1975)
- [120] A. Więckowski, Zastosowanie funkcji charakterystycznej do wyznaczania parametrów linii EPR zwężonej wymiennie, W: *Prace Komisji Matematyczno-Przyrodniczej - Fiz. Diel. Radiospek.*, **7** (2), 223—246 (1975)
- [121] J. H. Van Vleck, The dipolar broadening of magnetic resonance lines in crystals, *Phys. Rev.*, **74** (9), 1168-1183 (1948)
- [122] P. W. Anderson, P. R. Weiss, Exchange narrowing in paramagnetic resonance, *Rev. Mod. Phys.*, **25** (1), 269-276 (1953)

- [123] A. B. Więckowski, Numerical methods in resonance line shape analysis, *Nukleonika*, **42** (2), 589-594 (1997)
- [124] A. Więckowski, Zastosowanie metody elektronowego rezonansu paramagnetycznego w badaniach ultramaryny, *Wiad. Chem.*, **26** (12/306), 803-822 (1972)
- [125] J. A. Weil, J. R. Bolton, J. E. Wertz, *Electron paramagnetic resonance*, John Wiley & Sons, Inc. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore (1994), p. 492-497
- [126] R. Kirmse, J. Stach, *Spektroskopia EPR, zastosowania w chemii*, Uniwersytet Jagielloński, Kraków (1994)
- [127] B. Sczaniecki, Metody badań relaksacji spin-siatka w paramagnetykach, w: *Radiospektroskopia ciała stałego*, pod redakcją J. Stankowskiego, PWN Warszawa (1975), str. 233-251
- [128] G. E. Pake, *Paramagnetic resonance*, W. A. Benjamin, Inc. New York (1962), p. 29
- [129] W. E. Hatfield, Properties of magnetically condensed compounds (Compounds with spin exchange), in: *Theory and applications of molecular paramagnetism*, E. A. Boudreaux, L. N. Mulay, John Wiley & Sons, New York, London, Sydney, Toronto (1976), p.357-359
- [130] M. Pasenkiewicz-Gierula, R. C. Sealy, Analysis of the ESR spectrum of synthetic dopa melanin, *Biochem. Biophys. Acta*, **884**, 510-516 (1986)
- [131] M. S. Blois, A. B. Zahlan, J. E. Maling, Electron spin resonance studies on melanin, From the Biophysics Laboratory, Standford University, Standford, *Biophys. J.*, **4**, 471-490 (1964)
- [132] M. H. L. Pryce, A modified perturbation procedure for a problem in paramagnetism, *Proc. Phys. Soc. (London)*, **A63**, 25-29 (1950)
- [133] E. Buszman, B. Pilawa, M. Zdybel, D. Wrześniok, A. Grzegorzczak, T. Wilczok, Paramagnetic centers in DOPA-melanin-dihydrostreptomycin complexes, *Acta Phys. Pol. A.*, **108** (2), 353-356 (2005)
- [134] G. M. Zhidomirov, Ya. S. Lebedev, S. N. Dobryakov, N. Ya. Shteinshneider, A. K. Tshirkov, W. A. Gubanov, *Interpretatsiya slozhnykh spektrov EPR*, Izdatel'stvo *Nauka*, Moskva (1975), str. 71-94
- [135] S. K. Hoffmann, J. Goslar, L. S. Szczepaniak, M. Osman, EPR investigation of tridentate hydroxynaphthoylhydrazone derivatives copper(II)

complexes, RAMIS-83, Proceedings of the Conference Radio- and Microwave Spectroscopy, Poznań (1985), p. 307-314

[136] S. Hoffmann, Badanie kompleksów miedziowych w kryształach metodą elektronowego rezonansu paramagnetycznego, w: Radiospektroskopia ciała stałego, pod red. J. Stankowskiego, PWN, Warszawa (1975), str. 121-170

[137] Y. Ridente, G. C. Azzellini, A. S. Ito, Free radicals in melanin-cationic porphyrins complexes in dark and under light irradiation, *Pig. Cell. Res.*, **6**, 134-139 (1993)

[138] A. Stanisław, Przystępny kurs statystyki z wykorzystaniem programu STATISTICA PL na przykładach z medycyny, tom II, Statsoft Polska, Kraków (2000), str. 180

[139] Program STATISTICA, Firma SYSTAT, Evanston, 1992

[140] T. Wilczok, B. Bilińska, E. Buszman, M. Kopera, Spectroscopic studies of chemically modified synthetic melanins, *Archiv. Biochem. Biophys.*, **231** (2), 257-262 (1984)

[141] J. Moszew, *Chemia organiczna*, PWN, Łódź, Warszawa, Kraków (1962), str. 142, 275, 285, 442

[142] M. Maćkowiak, M. Kurzyński, Formalism of the rhombic spin Hamiltonian with $S = 2$ and its application to EPR spectra of copper aggregates in TGFB:Cu²⁺, *Phys. Stat. Sol.*, **51(b)**, 841 (1972)

[143] J. Stankowski, M. Maćkowiak, EPR of the four-copper-ion complex with spin $S = 2$ in triglycine fluoroberylate monocrystals, *Phys. Stat. Sol.*, **51(b)**, 449 (1972)

[144] M. Maćkowiak, Investigation of spin quintet states by electron paramagnetic resonance, *Il Nuovo Cimento*, **B29**, B(1), 207 (1975)

7. STRESZCZENIE

Praca zawiera wyniki badań DOPA-melaniny oraz jej kompleksów z kanamycyną i jonami miedzi(II) metodą elektronowego rezonansu paramagnetycznego EPR.

Melanina (eumelanina, feomelanina) nadaje barwę skórze, włosom, oczom. Melanina występuje również w organizmach roślinnych (allomelanina). Eumelanina nadaje czarny kolor, feomelanina natomiast kolor brązowy, rudy. Feomelanina zawiera siarkę, która odpowiedzialna jest za ten efekt. Neuromelanina występująca w *substantia nigra*, odgrywa rolę w chorobie Parkinsona i Alzheimer. Najczęściej w organizmach żywych występuje eumelanina. Modelową eumelaniną jest badana w niniejszej pracy DOPA-melanina.

Polimery melaninowe posiadają charakterystyczne własności: nierozpuszczalność, półprzewodnictwo elektryczne, fotoprotekcja, trwałe paramagnetyzm, powinowactwo do jonów metali i leków. Mechanizm wiązania jonów metali i leków do melaniny nie jest do końca zrozumiały i wyjaśniony.

Struktura melaniny również nie została do tej pory dokładnie określona. W literaturze naukowej można znaleźć różne propozycje struktury tego polimeru. Podstawową jednostką strukturalną jest indolo-5,6-chinon, który był dyskutowany w niniejszej pracy w związku z identyfikacją centrów paramagnetycznych w melaninie.

EPR jest użyteczną metodą w badaniach melaniny ze względu na wysoką koncentrację centrów paramagnetycznych w melaninie. Centrum paramagnetyczne może stanowić wolny rodnik, w którym niesparowany elektron zlokalizowany jest na atomie tlenu lub na atomie azotu indol-5,6-semichinonu. Pod wpływem wprowadzonych domieszek (jony metali, substancje lecznicze) do polimeru melaninowego, obserwuje się zmiany w parametrach rejestrowanych widm EPR i dlatego technika EPR okazała się przydatna do oceny efektywności oddziaływań melanina-czynnik kompleksujący.

Celem pracy było określenie rodzajów i właściwości centrów paramagnetycznych w kompleksach DOPA-melaniny z kanamycyną i jonami

miedzi(II). Do badań przygotowano zestaw 17 próbek, które zróżnicowane są pod względem kolejności kompleksowania leku i jonów miedzi(II) oraz pod względem stężeń (1×10^{-5} , 5×10^{-5} , 1×10^{-4} , 5×10^{-4} , 1×10^{-3} M) roztworów chlorku miedzi CuCl_2 użytych podczas przeprowadzanych syntez.

Widma EPR rejestrowano za pomocą spektrometru na pasmo X (9,3 GHz) w temperaturze pokojowej. Analizowano kształt i parametry linii EPR, koncentrację centrów paramagnetycznych oraz wpływ mocy mikrofalowej na widma EPR. Przeprowadzono również poszukiwania termicznie wzbudzonych stanów trypletowych w próbkach melaninowych analizując widma EPR zarejestrowane w temperaturach 100-300 K.

W badaniach zastosowano kanamycynę należącą do grupy antybiotyków aminoglikozydowych, które są skuteczne w zwalczaniu zakażeń dróg moczowych, oddechowych, przewodu pokarmowego, zapalenia opon mózgowych, skóry i kości. Antybiotyki aminoglikozydowe wykazują również działanie ototoksyczne polegające na uszkodzeniu narządu słuchu i równowagi znajdujących się w uchu wewnętrznym.

Miedź (Cu) jest pierwiastkiem niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania organizmu (między innymi reguluje metabolizm). Nadmiar miedzi powoduje zmniejszenie stężenia hemoglobiny, uszkodzenia wątroby i nerek. Związki miedzi powodują również zatrucia ostre i przewlekłe.

W pracy analizowano kształt linii EPR melaniny. Uzyskane rezultaty potwierdzają dane literaturowe wskazujące na to, że kształt linii jest pośredni między linią o kształcie gaussowskim i lorentzowskim.

Analizie poddano koncentrację melaninowych centrów paramagnetycznych i zaobserwowano, że kanamycyna powoduje wzrost, natomiast jony miedzi(II) powodują spadek koncentracji centrów paramagnetycznych.

Na podstawie analizy widm EPR jonów miedzi(II) przedstawiono w pracy propozycje kwadratowego otoczenia jonów Cu(II) w melaninie.

Zbadano wpływ mocy mikrofalowej na wolnorodnikowe oraz miedziowe centra paramagnetyczne w melaninie. Zjawisko nasycenia mikrofalowego nie występuje w przypadku sygnału EPR pochodzącego od jonów miedzi(II), natomiast jest obserwowane dla rodnikowych centrów paramagnetycznych występujących w melaninie.

Sprawdzono hipotezę o występowaniu w kompleksach melaninowych termicznie wzbudzonych stanów trypletowych o spinie $S = 1$. Badania zależności temperaturowej intensywności sygnału EPR melaniny oraz jej kompleksów z kanamycyną i jonami miedzi(II) wykazały istnienie dwóch składników widma EPR, z których jeden spełnia prawo Curie i odpowiada centrom paramagnetycznym w stanie dubletowym ze spinem $S = \frac{1}{2}$, a drugi nie spełnia prawa Curie i odpowiada centrom paramagnetycznym w termicznie wzbudzonym stanie trypletowym ze spinem $S = 1$. Zaproponowano strukturę chemiczną termicznie wzbudzonych centrów paramagnetycznych o spinie $S = 1$ występujących w melaninie.

8. ABSTRACT

This work comprises the study of DOPA-melanin (DOPA = 3,4-dihydroxyphenyl-alanine) complexes with kanamycin and copper(II) ions made by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy.

Melanin (eumelanin and pheomelanin) is a pigment, which gives colour to skin, hair, and eyes. Melanin (allomelanin) exists in plant organisms too. Eumelanin gives a dark, black colour, and pheomelanin brownish-red. Pheomelanin contains sulphur, which is responsible for this effect. Neuromelanin existing in *substantia nigra*, plays role in Parkinson's and Alzheimer's diseases. Eumelanin mainly exists in living organism. DOPA-melanin is the model eumelanin.

Melanin polymers present characteristic properties: insolubility, organic semiconductor, photoprotectant, stable paramagnetism, affinity to ligands – drugs and metal ions. The mechanism of bonding drugs and metal ions with melanin has not been understood well so far.

For the research were prepared 17 melanin samples, which differed in complexing order of the drug and copper(II) ions, and in concentration (1×10^{-5} , 5×10^{-5} , 1×10^{-4} , 5×10^{-4} , 1×10^{-3} M) of CuCl_2 solutions used during the samples synthesis.

A typical aminoglycoside antibiotics – kanamycin was used in this work. Kanamycin is an anti-inflammatory drug. A prolonged use of this drug complexed with melanin leads to ototoxic (injuring organs) effects. The copper is a necessary element for normal functioning of the organism (regulation of metabolism).

The structure of melanin has not been well determined. The indol-5,6-quinone group is the fundamental compound forming melanin. This group was discussed in this work with reference to indication of paramagnetic centres of melanin.

The high concentration of paramagnetic centres in melanin makes the use of electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy possible. The unpaired electron localized on the oxygen atom in indol-5,6-quinone group is the paramagnetic centre with $S = \frac{1}{2}$ in melanin. After adding metal ions and drugs into melanin polymer, the changes in parameters of recorded EPR

spectra were observed. The EPR is a useful method for analysing these melanin-metal ions and melanin-drugs interactions.

In this work EPR spectra were measured by the use of an X-band (9,3 GHz) electron paramagnetic resonance spectrometer at room temperature.

Shape and parameters of EPR lines, paramagnetic centres concentrations, and influence of microwave power on EPR spectra were analysed. To search thermally excited triplet states in melanin EPR spectra were recorded at 100-300 K.

The analysis of Cu(II) EPR spectra allows indicating of square coordination of these ions in melanin.

Kanamycin causes the increase of paramagnetic centres in melanin, and copper(II) ions its decrease. When the increase of metal ions concentration takes place, the decrease of radicals in the samples is noticed.

The microwave saturation is characteristic for all recorded EPR lines of DOPA-melanin and the EPR spectra of copper(II) are not saturated with the used microwave power range. The method of microwave saturation provides information about relaxation time in melanin complexes.

The analysis of temperature dependence of intensity of EPR spectra of investigated samples, indicated existence of two components in these spectra. The one of them fulfils the Curie law and the paramagnetic centres have a spin $S = \frac{1}{2}$. The second, corresponds to paramagnetic centres in thermally excited triplet states with $S = 1$. The scheme of structures of paramagnetic centres with spin $S = 1$ was made.