



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Ramanowska aktywność optyczna związków biologicznie czynnych: od małych monomerów po złożone układy supramolekularne

mgr Monika Anna Hałat

Celem badań naukowych, prowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej jest analiza aktywności optycznej oraz struktury, z jednej strony prostych cząsteczek chiralnych, a z drugiej złożonych układów wykazujących chiralność na poziomie supramolekularnym. Do badań wybrano naturalnie występujące związki, należące do grupy sacharydów oraz karotenoidów, pełniące zatem istotne funkcje biologiczne – w oparciu, o które otrzymano wiele zagregowanych systemów supramolekularnych. Pomiary chiralooptyczne wykonano za pomocą zaawansowanych technik spektroskopowych, takich jak: elektronowy dichroizm kołowy (ECD, ang. *Electronic Circular Dichroism*) oraz ramanowska aktywność optyczna (ROA, ang. *Raman Optical Activity*). Ponadto, dla badanych układów supramolekularnych zarejestrowano efekt AIRROA (ang. *Aggregation-Induced Resonance Raman Optical Activity*) – indukowany agregacją ksantofili efekt rezonansowego wzmocnienia ramanowskiej aktywności optycznej, który w porównaniu do konwencjonalnej techniki ROA umożliwia pomiary związków chiralnych w niewielkim stężeniu oraz znacząco skraca czas akumulacji widm.

W pierwszej części pracy przeprowadzono szczegółową analizę spektralną widm ROA otrzymanych dla szeregu wodnych roztworów węglowodanów, wybranych spośród mono-, di-, tri-, oligo- oraz polisacharydów. Co więcej, eksperymentalne widma ROA uzyskane dla: 2-deoksy-D-(-)-rybozy, 2-deoksy-D-(+)-glukozy, D-(+)-rafinozy oraz glikogenu, zarejestrowano po raz pierwszy w ramach realizacji niniejszej pracy doktorskiej. Zebrane wyniki pozwoliły na analizę struktury badanych węglowodanów, przede wszystkim na usystematyzowanie znanych w literaturze markerów spektroskopowych m.in. pierścieni piranozy i furanozy, anomarów α i β oraz pasm czułych na konfigurację wiązania glikozydowego. Należy podkreślić, iż większość pomiarów ROA wodnych roztworów sacharydów, opisanych w literaturze, wykonano w latach 90-tych, a ówczesne ograniczenia techniczne uniemożliwiły rejestrację pasm z zakresu niskich liczb falowych. Dwudziestoletni rozwój techniki ROA, a dokładniej wykorzystanie do badań spektrometru przystosowanego do techniki SCP, pozwoliło na uzyskanie widm o znacznie lepszym stosunku sygnału do szumu, na rejestrację i następnie analizę mało intensywnych pasm ROA z zakresu niskich liczb falowych, a tym samym wyróżnienie nowych markerów spektroskopowych, ważnych pod względem konfiguracji absolutnej centrum anomerycznego.

W drugiej części pracy dokonano identyfikacji oraz oceny chiralności i struktury przestrzennej supramolekularnych agregatów zeaksantyny – chiralnego ksantofilu szeroko rozpowszechnionego w przyrodzie. Zeaksantyna agreguje w udowodnionych rozpuszczalnikach organicznych, tworząc układy supramolekularne o upakowanej strukturze (ang. *card-packed*), tj. agregaty typu H oraz systemy odznaczające się luźniejszą budową (ang. *head-to-tail*), tj. agregaty typu J. Dobierając odpowiednie warunki agregacji otrzymano oba rodzaje zagregowanych układów zeaksantyny, które następnie poddano badaniom chiralnoptycznym. Widma ECD otrzymane dla układów H i J, przejawiały silne dwuznakowe efekty Cottona, o intensywności wielokrotnie wyższej niż dla monomerycznej formy ksantofilu o takim samym stężeniu. Silna aktywność optyczna zagregowanych systemów ksantofili wynika z chiralnej orientacji łańcuchów polienowych w strukturze agregatu, która z kolei jest związana z obecnością centrów chiralności w terminalnych pierścieniach β cząsteczki. Opierając się na spektralnych profilach widm ECD stwierdzono, iż enancjomer (3*R*,3'*R*)-zeaksantyny buduje agregaty H i J o helisie prawoskrętnej, z kolei enancjomer (3*S*,3'*S*)-zeaksantyny o helisie lewoskrętnej. Badania w tej części pracy dowodzą, iż chiralność monomeru na poziomie molekularnym warunkuje

chiralność agregatu na poziomie supramolekularnym. Co więcej, tylko agregaty J ZXT umożliwiły rejestrację efektu AIRROA, która w przypadku agregatów H ZXT okazała się niemożliwa, ze względu na przesunięty hipsokromowo zakres absorpcji ECD, nie występujący w zakresie linii wzbudzenia ROA (532 nm).

Trzeci ważny kierunek badań niniejszej rozprawy doktorskiej koncentruje się na procesie indukcji chiralności w układach supramolekularnych, zbudowanych z chiralnych i achiralnych molekuł. Motywacją tej części pracy stała się obserwacja silnej aktywności optycznej dla próbek naturalnych kryształów karotenoidowych, wyizolowanych z korzenia marchwi, zbudowanych w większości z achiralnych cząsteczek β -karotenu (95%), z niewielkim tylko dodatkiem chiralnych karotenoidów. Obserwacja ta pozwoliła na sformułowanie hipotezy, iż właściwości optyczne tych krystalicznych agregatów o znacząco achiralnym składzie są efektem procesu indukcji chiralności. W celu potwierdzenia hipotezy, uzyskano i zbadano kilka mieszanych układów modelowych, składających się z chiralnych i achiralnych komponentów. Na podstawie zebranych wyników potwierdzono, iż proces indukcji chiralności achiralnych cząsteczek β -karotenu, w strukturze agregatów modelowych oraz naturalnych kryształów karotenoidowych, występuje zgodnie z mechanizmem „sierżanta i żołnierzy” (ang. *sergeant and soldier effect*), gdzie chiralny karotenoid pełni rolę „sierżanta” kontrolującego achiralne cząsteczki „żołnierzy”. Niewielka ilość domieszek chiralnych (nawet kilka %), zmieszanych z achiralnym analogiem, generuje wzmocnienie lokalnej chiralności, która następnie jest transferowana na cały układ supramolekularny wykazujący intensywny sygnał optyczny. Ponadto, analiza widm RROA otrzymanych dla kryształów karotenoidowych oraz systemów modelowych pozwoliła na wyróżnienie kilku markerów spektroskopowych, potwierdzających proces indukcji chiralności β C w badanych układach supramolekularnych.

W niektórych przypadkach transfer informacji chiralnej podyktowany jest obecnością silnie chiralnego otoczenia. Ostatecznie dla lepszego zrozumienia procesu indukcji chiralności, pomiary chiralooptyczne wykonano również dla systemów otrzymanych w wyniku agregacji achiralnego ksantofilu (kantaksantyny) w wodnym roztworze chiralnego polisacharydu. Kantaksantyna agreguje w uwodnionych rozpuszczalnikach organicznych, tworząc nieaktywne optycznie układy supramolekularne. Zasadniczą zmianę właściwości chiralooptycznych zagregowanych układów ksantofilu zaobserwowano po 24 godzinach od momentu dodania do organicznego roztworu

barwnika wodnego roztworu glikozaminoglikanu, tj. hialuronianu sodu oraz heparyny. Otrzymane systemy wykazały indukowaną aktywność optyczną na poziomie supramolekularnym, zarejestrowaną w postaci intensywnych widm ECD i rezonansowo wzmocnionych widm ROA. Co więcej, analiza widm UV-VIS pozwoliła stwierdzić, iż w czasie tym dochodzi do przebudowy struktury badanych agregatów. Zaraz po przeprowadzeniu agregacji powstają nieaktywne optycznie układy typu H, które podczas okresu stabilizacji ulegają przebudowie do chiralnych układów typu J. Zatem, badania chiralooptyczne opisane w tej części pracy stanowią potwierdzenie, iż agregacja achiralnych cząsteczek kantaksantyny w obecności chiralnych polisacharydów prowadzi do uzyskania aktywnych optycznie układów, które wykazują indukcję chiralności na poziomie supramolekularnym.