

**Instytut Fizyki Jądrowej
Im. Henryka Niewodniczańskiego
Polska Akademia Nauk**



Badanie stanów elektronowych metali 3d w układach złożonych
metodami spektroskopii promieniowania X.

Michał Nowakowski

*Praca na stopień doktora nauk fizycznych wykonana pod kierunkiem
prof. dr. hab. Wojciecha M. Kwiatka i dr inż. Joanny Czapli-Masztafiak*

Kraków 2019

Podziękowania

Na początku, chciałbym serdecznie podziękować za wszystko mojemu Promotorowi prof. dr hab. Wojciechowi M. Kwiatkowi oraz Promotorowi Pomocniczemu dr inż. Joannie Czapli-Masztafiak. Okazali ogromną cierpliwość i wsparcie, a wiedza, którą mi przekazali oraz liczne wskazówki i dobre rady, którymi potrafili zawsze wspomóc okazały się bezcenne.

Serdecznie dziękuję również panu dr hab. Jakubowi Szlachetko za pomoc w pomiarach, analizie wyników i za wprowadzenie mnie w teorię RXES. Dziękuję panu prof. Maciejowi Kozakowi i dr Igorowi Zhukowowi za możliwość wykonania pomiarów oraz przygotowanie próbek białka i bardzo dobrą współpracę.

Podziękowania kieruję do dr inż. Konrada Tkocza za doskonałą atmosferę pracy, dr Anny Wach za przetrwanie i pomoc podczas kluczowych pomiarów w Hamburgu oraz do mgr Żanety Kołodziejczyk, która nauczyła mnie preparatyki liposomów.

Dziękuję również całemu Zakładowi NZ52 za cenne uwagi i bardzo przyjazną atmosferę pracy.

Mojej Narzeczonej, bez której nic by się nie udało i Mamie, które zawsze mnie wspierały oraz wierzyły we mnie nawet, gdy sam wątpiłem.

Badania zawarte w niniejszej rozprawie były częściowo finansowane przez
Narodowe Centrum Nauki w ramach projektów:

"Badanie mechanizmu i efektów oddziaływania błon lipidowych ze związkami
chromu-VI przy pomocy spektroskopii rentgenowskiej oraz metod
komplementarnych" – kierownik mgr Michał Nowakowski
2016/23/N/ST4/01601

oraz

„Molekularne podstawy amyloidogenezy – struktura i dynamika konformacyjna
wybranych kompleksów ludzkiego białka prionowego PrP^c z kationami metali”
– kierownik prof. dr hab. Maciej Kozak (Uniwersytet Adama Mickiewicza
w Poznaniu) oraz prof. dr hab. Wojciech M. Kwiatek (Instytut Fizyki Jądrowej
PAN w Krakowie)
2014/15/B/ST4/04839

Część badań zostało wykonanych z wykorzystaniem aparatury zakupionej
w ramach projektu współfinansowanego ze środków Małopolskiego
Regionalnego Programu Operacyjnego Działanie 5.1 Krakowski Obszar
Metropolitalny jako ważny węzeł europejskiej przestrzeni badawczej na lata
2007-2013, projekt nr MRPO.05.01.00-12-013/15.

STRESZCZENIE

Spektroskopia rentgenowska z wykorzystaniem Promieniowania Synchrotronowego jest zbiorem technik badawczych rozwijanych od dziesięcioleci. Spektroskopia absorpcyjna promieniowania X (XAS) pozwala otrzymać informację strukturalną i konfigurację elektronowych stanów nieobsadzonych badanego związku. Spektroskopia emisyjna promieniowania X (XES), pozwala na otrzymanie komplementarnej do XAS informacji strukturalnej oraz konfiguracji elektronowych stanów obsadzonych. Połączenie tych metod stanowi nowatorska spektroskopia RXES umożliwiająca zebranie analogicznych informacji w jednym eksperymencie. Dotychczas, spektroskopia RXES była głównie wykorzystywana w badaniach z dziedziny ciała stałego.

Celem niniejszej rozprawy było wykonanie pomiarów metali 3d w różnych typach próbek i wykazanie różnic pomiędzy metodami XAS i $K\beta$ RXES. Opisane zostały trzy eksperymenty podejmujące aktualne problemy badawcze, wykonane przy pomocy metod XAS i RXES oraz wsparte obliczeniami DFT i *ab-initio* wykonanymi przy pomocy teorii FMS. Pierwszy eksperyment skupiał się na zastosowaniu metody $K\beta$ RXES do wyznaczenia struktury przerwy energetycznej w związkach nieorganicznych żelaza. Stanowi on podsumowanie możliwości metody RXES w dotychczasowych zastosowaniach fizyki ciała stałego. Ponadto, wprowadzony został nowy sposób radzenia sobie z efektem samoabsorpcji widocznym w widmach XAS. Drugi eksperyment to analiza mechanizmu oddziaływania białka PrP^C z jonami Cu(II). Jest to przykład badania struktury heterogenicznej, przy użyciu spektroskopii absorpcyjnej przy krawędzi K Cu. W trakcie analizy został zidentyfikowany unikatowy proces transferu ładunku z ligandów na jon Cu(II) (LMCT) oraz przedstawiono rozwiązanie struktury kompleksu PrP^C-Cu(II). Trzeci eksperyment to rozwiązanie problemu oddziaływania Cr(VI) z błonami lipidowymi. W tym przypadku zostały zastosowane i porównane obie techniki: XAS i $K\beta$ RXES. W trakcie doświadczenia wykazano istnienie mechanizmu przechodzenia Cr(VI) przez błony lipidowe przy jednoczesnym wykorzystaniu potencjału redoks reakcji redukcji Cr(VI) -> Cr(III)/Cr(IV). W rezultacie obliczeń DFT i *ab-initio* zaproponowano i potwierdzono model tworzenia krótko żyjących kanałów w błonie lipidowej przy jednoczesnym trwałym wiązaniu Cr do składników błon.

W trakcie analizy wyników, pokazane zostało zastosowanie spektroskopii $K\beta$ RXES do badania materii organicznej i heterogenicznej. Dzięki temu udowodniono, iż przy pomocy techniki $K\beta$ RXES możliwe jest pełne zrozumienie natury zachodzących zjawisk w tego typu

próbkach. Pozwoli to na rozwinięcie metodologii badawczej, znacznie wykraczające poza dotychczasowe zastosowania fizyki ciała stałego.

SUMMARY

X-Ray spectroscopy with use of Synchrotron Radiation is a set of experimental techniques that were being under development for decades. The X-Ray Absorption Spectroscopy (XAS) allows to obtain structural and electronic information regarding unoccupied electronic states in studied compound. On the contrary, the X-Ray Emission Spectroscopy (XES) allows to obtain complementary to XAS structural and electronic information about unoccupied electronic states in studied compound. The RXES technique merges aforementioned methods and enabled to simultaneously collect all structural and electronic information in one experiment. Up to now, the RXES technique was used in majority to study solid-state samples.

The purpose of this thesis was to study 3d metals in various sample types and to demonstrate divergences between the RXES and both XAS and XES methods. Three experiments, that were challenging actual research problems, were pictured. They were conducted with use of XAS and $K\beta$ RXES techniques with support of a DFT and *ab-initio*, the FMS theory-based calculations. The first experiment was focused on application of $K\beta$ RXES to characterise band gap in inorganic reference iron compounds. This study is a sum up of the RXES technique capabilities in application to classical solid state physics scientific problems. Additionally, a new way of handling the self-absorption effect in XAS spectra was introduced. The second experiment was focused on interaction of the PrP^C protein with Cu(II) ions. This was an example of study of heterogenic structure with use of X-Ray absorption spectroscopy near Cu K edge. During data analysis a new, unique mechanism of charge transfer from ligands to metal (LMCT) was identified as well as the PrP^C-Cu(II) complex structure was solved. The third experiment tackled the problem of Cr(VI) impact on lipid membranes. In this case both XAS and $K\beta$ RXES techniques were utilised. As a result it was proven that Cr can pass throughout lipid membrane with simultaneous redox reaction $Cr(VI) \rightarrow Cr(III)/Cr(IV)$ taking place. The model of Cr binding to membrane content and creation of short living channels in a lipid membrane were proposed and proved with use of DFT and *ab-initio* calculations.

During data analysis, application of the $K\beta$ RXES method in organic and heterogenic samples. It was shown that with use of the $K\beta$ RXES technique, one can obtain full understanding the nature of the phenomena occurring in this type of samples. In future, it will allow to extend methodology of study, much beyond the actual solid state physics scope of applications.

Spis treści

Wykaz skrótów	4
SPIS RYSUNKÓW	7
SPIS TABEL	20
I. Promieniowanie rentgenowskie	21
I. 1 Podstawowe własności promieniowania rentgenowskiego	21
I. 2 Synchrotron jako źródło promieniowania X.....	25
A. Budowa synchrotronu [4,5]	25
B. Urządzenia wstawkowe i własności promieniowania synchrotronowego [4,5] 26	
C. Budowa linii eksperymentalnej [8]	29
II. Spektroskopia rentgenowska	31
II. 1 Spektroskopia absorpcyjna promieniowania rentgenowskiego.....	31
A. Struktura przy krawędzi absorpcji	31
B. Struktura subtelna powyżej krawędzi absorpcji – EXAFS [10].....	36
C. Metody pomiaru widm absorpcyjnych [10][11]	40
D. Efekt samoabsorpcji [15]	44
II. 2 Spektroskopia Emisyjna Promieniowania Rentgenowskiego	47
A. Spektroskopia Emisyjna Promieniowania X [19]	47
B. Spektroskopia Rezonansowej Emisji Rentgenowskiej [19,29,30].....	50
C. Układy pomiarowe	55
III. Metody obliczeniowe	59
III. 1 Podstawowe metody analizy widm rentgenowskich	59
A. Wstępna analiza widm XAS.....	59
B. Procedura kombinacji liniowej widm referencyjnych.....	60
III. 2 Obliczanie widm ab-initio metodą wielokrotnego rozpraszania funkcji elektronowej [59–61]	61
A. Hamiltonian oddziaływania i potencjał miseczkowy	61
B. Propagator Greena	62
C. Wielokrotne rozpraszanie [55].....	63
D. Obliczanie funkcji LDOS, widm XAS i XES w formalizmie MS/FMS [61] za pomocą programu FEFF 9.6 [60]	64

III. 3	Uwzględnienie efektu samoabsorpcji w widmach <i>ab-initio</i>	66
III. 4	Obliczanie map RXES	68
IV.	Teza i cele pracy.....	70
V.	Struktura elektronowa referencyjnych związków żelaza otrzymana metodą RXES	71
V. 1	Wstęp	71
V. 2	Opis eksperymentu.....	74
V. 3	Analiza i wyniki	76
V. 4	Podsumowanie	86
VI.	Badanie kompleksów białka prionowego z jonami Cu(II) metodą XANES	87
VI. 1	Wstęp	87
A.	<i>Choroby neurodegeneracyjne</i>	87
B.	<i>Białko PrP^C</i>	87
C.	<i>Struktura kompleksów PrP^C-Cu(II)</i>	90
VI. 2	Opis eksperymentu.....	92
A.	<i>Otrzymywanie białka PrP^C i tworzenie kompleksu PrP^C-Cu(II)</i>	92
B.	<i>Pomiary XAS kompleksów PrP^C-Cu(II)</i>	92
VI. 3	Analiza i wyniki	94
A.	<i>Pomiary XAS zliofilizowanego kompleksu PrP^C-Cu(II) na wiązce SuperXAS w PSI – otrzymanie struktury kompleksu PrP^C-Cu(II)</i>	94
B.	<i>Pomiary XAS wodnego roztworu kompleksu PrP^C-Cu(II) na wiązce SuperXAS w PSI</i>	105
VI. 4	Podsumowanie	121
VII.	Analiza lipidów poddanych działaniu Cr(VI).....	123
VII. 1	Wstęp.....	123
A.	<i>Wybrane właściwości chromu</i>	124
B.	<i>Błony lipidowe</i>	125
C.	<i>Oddziaływanie Cr(VI) z błonami lipidowymi</i>	126
VII. 2	Opis eksperymentu	128
A.	<i>Przygotowanie liposomów</i>	128
B.	<i>Dodanie K₂Cr₂O₇ do zawiesiny liposomów i przygotowanie próbek</i>	129
C.	<i>Pomiary XAS</i>	130
D.	<i>Pomiary RXES</i>	131
E.	<i>Pomiary uzupełniające</i>	132

VII. 3	Wyniki i dyskusja	134
A.	<i>Analiza FTIR</i>	134
B.	<i>Pomiary XRD</i>	134
C.	<i>Pomiary XAS i XRF</i>	137
D.	<i>Pomiary RXES</i>	150
VII. 4	Podsumowanie	168
VIII.	Wnioski końcowe	169
ZAŁĄCZNIKI	172
Załącznik A	172
Załącznik B	175
Załącznik C	177
Załącznik D	181
Załącznik E	184
Literatura	185

Wykaz skrótów

Skrót	Rozwinięcie
(hu)PrP ^C	Ang. (<i>human</i>) <i>Cellular Proteinase Resistant Protein</i> , ludzkie białko prionowe pochodzenia komórkowego
°C	Stopień Celsjusza, jednostka temperatury
3D	Obraz lub struktura trójwymiarowa
CRIO	Warunki temperatury kriogenicznej otoczenia, 10 K
DCM	Ang. <i>Double Crystal Monochromator</i> , monochromator zbudowany z dwóch kryształów
def2/J	Bazą wspomagająca orbitali oznaczona jako def2/J
DESY	Ger. <i>Deutsches Elektronen-Synchrotron</i> , niemiecki instytut w którym przeprowadzono eksperymenty na linii P64
DFT	Ang. <i>Density Functional Theory</i> , Teoria Funkcjonału Gęstości
DMPC	Ang. <i>1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine</i> , 1,2-dimyristoilo-sn-glicero-3-fosfocholina, fosfolipid nasycony
DOPE	Ang. <i>1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine</i> , 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanoloamina, fosfolipid nienasycony
DOS	Ang. <i>Density of States</i> , funkcje gęstości stanów elektronowych
ECP	Ang. <i>Exchange-Correlation Potential</i> , Potencjał Korelacyjno-Wymienny
E_F	Energia Fermiego
EPR	Ang. <i>Electron Paramagnetic Resonance</i> , Elektronowy Rezonans Paramagnetyczny
ESRF	<i>European Synchrotron Radiation Facility</i> , synchrotron w którym wykonano pomiary na linii eksperymentalnej BM25-A
eV	Elektronowolt, jednostka energii
EXAFS	Ang. <i>Extended X-Ray Absorption Fine Structure</i> , Struktura Subtelna Widma Absorpcyjnego - metoda eksperymentalna i nazwa fragment widma absorpcyjnego
FEFF	Program do obliczania widm rentgenowskich <i>ab-initio</i> w oparciu o formalizm wielokrotnego rozpraszania
FEL	Ang. <i>Free Electron Laser</i> , Laser na Swobodnych Elektronach
FFT	Ang. <i>Fast Fourier Transform</i> , Szybka Transformata Fouriera
FMS	Ang. <i>Full Multiple Scattering</i> , teoria Pełnego Wielokrotnego Rozpraszania, metoda obliczania widm XANES wykorzystana w programie FEFF
FSR	Ang. <i>Final State Rule</i> , Zasada Stanu Końcowego, jeden z modeli opisujących oddziaływanie fotoelektronu i dziury rdzeniowej
FTIR	Ang. <i>Fourier Transform Infrared</i> , Spektroskopia w Podczerwieni z Transformata Fouriera
GeV	Gigaelektronowolt, jednostka energii równa 10 ⁹ elektronowoltów
GUI	Ang. <i>Graphical User Interface</i> , Interfejs Graficzny Użytkownika
-HC=CH-	Wiązanie nienasycone w fosfolipidzie DOPE
HEROS	Ang. <i>High Resolution Off Resonant Spectroscopy</i> , Wysokorozdzielcza Pozarezonansowa Spektroskopia Emisyjna Promieniowania X
HR-XAS	Ang. <i>High Resolution X-Ray Absorption Spectroscopy</i> , Wysokorozdzielcza Spektroskopia Absorpcyjna Promieniowania X
HR-XES	Ang. <i>High Resolution X-Ray Emission Spectroscopy</i> , Wysokorozdzielcza Spektroskopia Emisyjna Promieniowania X
KB	Zwierciadło Kirkpatrick'a-Baez'a
keV	Kiloelektronowolt, jednostka energii równa 10 ³ elektronowoltów
KH	Równanie Kramersa-Heisenberga
kHz	Kilohertz, jednostka częstotliwości równa 10 ³ Hertzów
K β XES	Ang. <i>Kβ X-Ray Emission Spectroscopy</i> , Spektroskopia Emisyjna Promieniowania X w zakresie linii K β (K $\beta_{1,3}$ i K $\beta_{2,5}$)

LCF	Ang. <i>Linear Combination Fitting</i> , dopasowywanie kombinacji liniowej widm referencyjnych, metoda analizy widm XAS
LMCT	Ang. <i>Ligand-To-Metal Charge Transfer</i> , zjawisko fizyczne transportu elektronów z orbitali walencyjnych ligandu na orbitale walencyjne metalu
LSRF	Ang. <i>Large Scale Research Facilities</i> , Duże Ośrodki Badawcze
MeV	Megaelektronowolt, jednostka energii równa 10^6 elektronowoltów
MS	Ang. <i>Multiple Scattering</i> , teoria wykorzystana w programie FEFF do obliczania widm <i>ab-initio</i> EXAFS
NIST	Ang. <i>National Institute of Standards and Technology</i> , Narodowy Instytut Standaryzacji i Technologii w Stanach Zjednoczonych
NMR	Ang. <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> , spektroskopia Jądrowego Rezonansu Magnetycznego
nXES	Ang. <i>non-resonant X-Ray Emission Spectroscopy</i> , nierezonansowa Spektroskopia Emisyjna Promieniowania X
PDB	Ang. <i>Protein Data Bank</i> , cyfrowe repozytorium zawierające struktury przestrzenne białek
pH	Ilościowa skala kwasowości roztworów wodnych
PrP	Ang. <i>Proteinase Resistant Protein</i> , ludzkie białko prionowe
PrP ^{Sc}	Ang. <i>scrapie Proteinase Resistant Protein</i> , ludzkie białko prionowe w formie <i>scrapie</i> (patologicznej)
PSD	Ang. <i>Position Sensitive Detector</i> , typ detektora promieniowania X
PSI	Ger. <i>Paul Scherrer Institut</i> , szwajcarski instytut badawczy im. Paula Scherrer'a zawierający synchrotron Swiss Light Source, na którym wykonano eksperymenty na wiązce SuperXAS
RDF	Ang. <i>Radial Density Function</i> , Funkcja Rozkładu Radialnego atomów
RI	Ang. <i>Repulsion Integral</i> , przybliżeniem Całki Odpychania
RIXS	Ang. <i>Resonant Inelastic X-Ray Scattering</i> , Rezonansowe Nieelastyczne Rozpraszanie Promieniowania X, metoda pomiarowa widm rentgenowskich, w obszarze krawędzi absorpcji, zwana też RXES
RPA	Ang. <i>Random Phase Approximation</i> , jeden z modeli opisujących oddziaływanie fotoelektronu i dziury rdzeniowej
RT	Ang. <i>Room Temperature</i> , warunki temperatury pokojowej otoczenia
RXES	Ang. <i>Resonant X-Ray Emission Spectroscopy</i> , Rezonansowa Spektroskopia Emisyjna Promieniowania X, metoda pomiarowa widm rentgenowskich XAS i XES w obszarze krawędzi absorpcji odpowiada metodzie RIXS
SA	Ang. <i>Self-Absorption</i> , zjawisko fizyczne Samoabsorpcji
SCF	Ang. <i>Self Consistent Field</i> , algorytm Pola Samouzbieżnionego
SLS	Ang. <i>Swiss Light Source</i> , szwajcarski synchrotron w Paul Scherrer Institut
SR	Ang. <i>Synchrotron Radiation</i> , Promieniowanie Synchrotronowe
SVP	Ang. <i>Split-Valence Polarization</i> , baza orbitali z polaryzacją rozdzieloną walencyjnie
T_c	Temperatura krytyczna (przejścia fazowego w błonach lipidowych)
TEM	Ang. <i>Transmission Electron Microscopy</i> , Transmisyjna Mikroskopia Elektronowa
TFY	Ang. <i>Total Fluorescence Yield</i> , metoda pomiaru widm XAS, mod fluorescencyjny
TSE	Ang. <i>Transmissible Spongiform Encephalopathies</i> , Pasożowlane Encefalopatie Gąbczaste, grupa chorób neurodegeneracyjnych
UFF	Ang. <i>Universal Force Field</i> , Uniwersalne Pole Siłowe, pole siłowe służące do obliczeń w mechanice molekularnej
UHF	Ang. <i>Unrestricted Hartree-Fock</i> , teoria uwzględniająca niesparowane spiny w obliczeniach DFT
UV	Ang. <i>Ultraviolet</i> , promieniowanie z zakresu ultrafioletowego
v2c	Ang. <i>Valence to Core</i> , fragment widma XES obejmujący przejścia elektronowe na orbitale walencyjne i ligandów
W	Wat [J/s], jednostka mocy
XANES	Ang. <i>X-Ray Absorption Near Edge Structure</i> , Spektroskopia Absorpcyjna Promieniowania X przy Krawędzi Absorpcji

XAS	Ang. <i>X-Ray Absorption Spectroscopy</i> , Spektroskopia Absorpcyjna Promieniowania X
XES	Ang. <i>X-Ray Emission Spectroscopy</i> , Spektroskopia Emisyjna Promieniowania X
XPS	Ang. <i>X-Ray Photoemission Spectroscopy</i> , Spektroskopia Emisji Fotoelektronów
XRD	Ang. <i>X-Ray Diffraction</i> , Dyfrakcja Rentgenowska
XRF	Ang. <i>X-Ray Fluorescence</i> , spektrometria Fluorescencji Rentgenowskiej
ΔE_g	Wartość przerwy energetycznej między pasmem walencyjnym i pasmem przewodnictwa
Δ RXES	Różnicowa mapa RXES

SPIS RYSUNKÓW

Rozdział I

- Rysunek I.1 *Wykres obrazujący wkłady poszczególnych oddziaływań do całkowitego masowego współczynnika absorpcji. W celu wizualizacji zależności wybrano równomolową mieszaninę pierwiastków: Na, S, Ti, Cr, Fe, Cu, Zn, Ag, Au, U. Pionowa przerywana linia wskazuje umowną granicę między promieniowaniem rentgenowskim, a gamma. Obliczenia wykonano na podstawie tablic National Institute of Standards and Technology (NIST) [66]* 22
- Rysunek I.2 *Krawędzie absorpcji wyznaczone dla mieszaniny pierwiastków: Na, S, Ti, Cr, Fe, Cu, Zn, Ag, Au, U w stosunku równomolowym każdy. Obliczenia wykonano na podstawie tablic National Institute of Standards and Technology (NIST) [66].* 24
- Rysunek I.3 *Schemat synchrotronu III generacji z najważniejszymi elementami. W celu zachowania przejrzystości rysunku, nie zaznaczono na nim urządzeń wstawkowych oraz nadprzewodzących wnęk rezonansowych.* 25
- Rysunek I.4 *Schemat prezentujący emisję promieniowania elektromagnetycznego w polu magnetycznym przez elektrony A – nierelatywistyczne; B – relatywistyczne. Rysunek przerysowany z [6].* 27
- Rysunek I.5 *Źródła promieniowania synchrotronowego: A – magnes zakrzywiający; B – wiggler; C – undulator. Rysunki B i C zaczerpnięto z [7].* 28
- Rysunek I.6 *Ogólny schemat optyki stosowanej na wiązce eksperymentalnej dedykowanej pomiarom w obszarze twardego promieniowania X. Schemat zaczerpnięty ze strony internetowej linii eksperymentalnej P64 na synchrotronie Petra III w DESY. [9]* 29

Rozdział II

- Rysunek II.1 *Schemat wzbudzenia stanu 1s w dowolnym atomie. Na początku promieniowanie o wysokiej energii pada na atom, następuje absorpcja kwantu promieniowania X i promocja elektronu na stan powyżej energii Fermiego (A). Wakancja w rdzeniu atomowym jest zapelniana przez elektron z wyższej powłoki przy czym emitowane jest charakterystyczne promieniowanie fluorescencji rentgenowskiej (B) Absorpcja oraz emisja zachodzą tylko z udziałem konkretnych poziomów energetycznych dozwolonych regułami wyboru (C). Na schemacie C zapelnienie dziury rdzeniowej zostało pokazane tylko dla stanu 1s (krawędź K).* 32
- Rysunek II.2 *Struktura widma XANES na przykładzie $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Zaznaczono piki: przedkrawędziowy, pochodzący od ligandu i powiązany z transferem ładunku oraz krawędź absorpcji, czyli, tzw. białą linię. Pomiaru widma dokonano na wiązce P64, na synchrotronie Petra III w Deutsches Elektronen-Synchrotron (DESY).* 34
- Rysunek II.3 *Absorpcja rentgenowska z podpowłoki 1s. Elektrony 1s znajdują się na dnie studni potencjału. Fotoelektron wybity przez kwant promieniowania X może różnie zachować się w zależności od początkowej energii padającego promieniowania. Albo pozostanie w polu oddziaływania atomu (niebieskie tło), albo zostanie wybity do Kontinuum, gdzie będzie się rozpraszal na sąsiednich atomach i autointerferował (żółte tło). $h\nu$ –kwant promieniowania X.* 39
- Rysunek II.4 *Schematyczne przedstawienie układów do pomiarów rentgenowskich absorpcyjnych: A – w modzie transmisyjnym; B – w modzie fluorescencyjnym. Na Rysunku zaznaczono również obszary wiązki pierwotnej I_0 i rejestrowanej I oraz komory jonizacyjne K_1 i K_2 .* 40
- Rysunek II.5 *Widma XANES ftalocyjanianu miedzi (II) zmierzone w modzie fluorescencyjnym (kolor czarny) oraz transmisyjnym (kolor czerwony) dla próbki w formie pastylki oraz roztworu wodnego (insert). Dla obu typów próbek stężenie absorbera nie* 42

- przekraczało 5 % suchej masy. Pomiarów dokonano na wiązce XAFCA na synchrotronie Singapore Synchrotron Light Source w Singapurze dzięki uprzejmości dr Agnieszki Banaś.
- Rysunek II.6 *Widma XANES $ZnSO_4 \cdot 5H_2O$ zmierzone w modzie fluorescencyjnym dla próbki o grubości 1 mm, w formie pastylki zawierającej różne stężenia związku w zakresie od 0.25 % do 20 %. Wyniki porównano do sygnału skorygowanego ze względu na efekt samoabsorpcji w programie Athena, przy użyciu algorytmu FLUO. Pomiarów dokonano na wiązce P64 na synchrotronie Petra III w Deutsches Elektronen-Synchrotron (DESY).* 45
- Rysunek II.7 *Schemat eksperymentu przeprowadzanego w geometrii fluorescencyjnej z uwzględnieniem efektu samoabsorpcji.* 47
- Rysunek II.8 *Nierezonansowe widmo XES dla $\alpha-Fe_2O_3$. Pokazano obszar energetyczny obejmujący piki $K\beta_{1,3}$ oraz obszar walencyjny (piki $K\beta_{2,5}$). Ponadto widoczne są piki satelitarne $K\beta'$ i $K\beta''$. Widmo otrzymano na wiązce SuperXAS (10XDA) w Swiss Light Source, Paul Scherrer Institut w Szwajcarii za pomocą dyspersyjnego spektrometru w geometrii von Hamosa.* 48
- Rysunek II.9 *A – Mapa RXES próbki $\alpha-Fe_2O_3$ wraz z zaznaczonymi najważniejszymi przejściami oraz obszarami poza-, nie-, i rezonansowymi; B – porównanie widma HR-XAS dla energii emisji 7055 eV z widmem TFY XAS; C – widmo HEROS otrzymane dla energii padającej 7105 eV; D – porównanie widm XES oraz HR-XES dla energii wiązki padającej równej 7114 eV; E – region walencyjny widma wmiśyjnego. Mapę otrzymano na wiązce SuperXAS (10XDA) w Swiss Light Source, Paul Scherrer Institut w Szwajcarii za pomocą dyspersyjnego spektrometru w geometrii von Hamosa. Niepewności na rysunkach C i E zostały wyznaczone jako \sqrt{N} , gdzie N to ilość zliczeń. Rysunek zaadaptowano z [33].* 54
- Rysunek II.10 *Geometrie pomiarów w układzie RXES. A – geometria Johanna, w której niedopasowanie promieni wycięcia kryształu i okręgu Rowlanda powoduje utratę zdolności rozdzielczej; B – geometria Johanssona, w której promienie wycięcia kryształu i okręgu Rowlanda do siebie idealnie pasują; C – geometria von Hamosa do pomiarów w energetycznym modzie dyspersyjnym.* 57

Rozdział III

- Rysunek III.1 *Redukcja danych w eksperymencie XAS przy pomocy programu Athena. A – surowe widmo XAS folii miedzianej wraz z funkcją tła oraz obszarami przedkrawędziowym, zakrawędziowym; B – widmo absorpcyjne Cu po normalizacji i korekcie samoabsorpcji.* 59
- Rysunek III.2 *Potencjały miseczkowe wokół dwóch rodzajów atomów zaznaczonych kolorem zielonym i niebieskim. Przerywane linie oznaczają umowną granicę sferycznego potencjału. Żółty kolor oznacza przestrzeń międzyatomową o stałej wartości potencjału.* 62
- Rysunek III.3 *Zarys działania programu FEFF 9.6.* 65
- Rysunek III.4 *Interfejs graficzny programu FEFF 9.6 z wczytanym plikiem wejściowym do obliczenia widma XANES hematytu.* 66
- Rysunek III.5 *Model oddziaływania wiązki padającej i wtórnej fluorescencji z próbką. Oznaczenia znajdują się w tekście.* 67

Rozdział V

- Rysunek V.1 *Schemat pasm energetycznych dla (A) Izolatora (B) Półprzewodnika (C) Przewodnika. Pasmowa teoria przewodnictwa zakłada istnienie pojedynczych stanów energetycznych elektronów w postaci funkcji falowych, które leżąc blisko siebie nakładają się tworząc pasma: walencyjne i przewodnictwa. Pasma te są oddzielone obszarem wzbronionym scharakteryzowanym wartością przerwy energetycznej. Wartość przerwy energetycznej oraz położenie pasm względem Energii Fermiego (przerywana linia) decydują o własnościach elektrycznych danego związku chemicznego.* 72
- Rysunek V.2 *Widok układu pomiarowego przygotowanego do kalibracji energetycznej, na linii SuperXAS, SLS, PSI. W układzie nie ma zamontowanego kryształu analizującego.* 74
- Rysunek V.3 *Widok programu RXES_GUI podczas kalibracji mapy RXES dla folii żelaznej. Inset przedstawia logo programu.* 75
- Rysunek V.4 *Redukcja szumu na mapie RXES na przykładzie wyników otrzymanych dla folii żelaznej: A – dane przed obróbką,* 76

bezpośrednio po pomiarze, oraz pojedynczy skan profilu tła dla energii 6970 eV (biała linia); B – dane z wyciętym obszarem zawierającym sygnał fluorescencyjny pochodzący od przejść elektronowych oraz piku elastycznego (kolor bordowy); C – profil zmienności tła otrzymany dla całej mapy; D – mapa RXES po odjęciu profilu zmienności tła.

- Rysunek V.5 *Mapy RXES zmierzonych próbek związków żelaza po odjęciu tła, kalibracji i normalizacji: A – folia żelazna; B – α -Fe₂O₃; C – Fe(NO₃)₃ x 9 H₂O.* 77
- Rysunek V.6 *A – widma XES wszystkich badanych próbek otrzymane w wyniku wykonania całkowania mapy RXES wzdłuż całej energii padającej promieniowania X. Insert z lewej strony przedstawia regiony walencyjne widm XES wszystkich związków, natomiast insert po prawej stronie przedstawia zbliżenie na maksimum linii K β _{1,3} wszystkich związków; B – widma XAS wszystkich badanych próbek otrzymane w wyniku wykonania całkowania mapy RXES wzdłuż całej energii emisji promieniowania X. Insert przedstawia widma wysokorozdzielcze XAS wydobyte z mapy RXES poprzez całkowanie intensywności fluorescencji dla energii emisji 7,055 keV. Słupki błędów oznaczają niepewności zdefiniowane jako pierwiastek z wariancji.* 78
- Rysunek V.7 *Identyfikacja szerokości przerwy energetycznej dla Fe(NO₃)₃ x 9 H₂O: A – dopasowanie funkcji Gaussa do danych eksperymentalnych; B – analiza widm zróżniczkowanych. Oryginalne zróżniczkowane widmo XES jest zbyt zaszumione. Pionowe przerywane linie pokazują zakres przerwy energetycznej.* 79
- Rysunek V.8 *Poszczególne etapy wyznaczenia stanów obsadzonych i nieobsadzonych (A-B) oraz zastosowana odwrotna korekta samoabsorpcji (C): A – funkcje DOS zestawione z funkcjami arcus tangens dla stanów obsadzonych i nieobsadzonych; B – funkcje DOS po rozdzieleniu na część obsadzoną i nieobsadzoną zestawione z funkcjami arcus tangens dla stanów obsadzonych i nieobsadzonych C – efekt działania korekty samoabsorpcji na widmo XAS żelaza.* 81

Rysunek V.9	<i>Wyniki eksperymentu obrazujące przerwę energetyczną: widma eksperymentalne oraz teoretyczne wraz z funkcjami DOS policzonymi w pakiecie FEFF i odtwarzającymi eksperyment dla: A – folii żelaznej; B – α-Fe₂O₃; C – Fe(NO₃)₃ x 9 H₂O.</i>	83
Rysunek V.10	<i>Mapy RXES zmierzonych próbek związków żelaza obliczone teoretycznie: A – folia żelazna; B – α-Fe₂O₃; C – Fe(NO₃)₃ x 9 H₂O.</i>	85
Rozdział VI		
Rysunek VI.1	<i>Struktura białka prionowego, jego zakotwiczenie w błonie komórkowej oraz szczegółowa budowa fragmentu „octarepeat”. Główną strukturę zaczerpnięto z pliku 2lmt.pdb, a strukturę domeny z pliku 2kkg.pdb z bazy RCSB PDB.</i>	88
Rysunek VI.2	<i>Schemat konwersji białka prionowego z α-helikalnej izoformy a) PrP^C do izoformy b) PrP^{Sc} bogatej w β-kardki. Rysunek pobrano z artykułu [126].</i>	89
Rysunek VI.3	<i>Pierwsza struktura jonu Cu(II) związanego przez peptyd HGGW, będący subsekwencją PHGGGWGQ. Rysunek skopiowany za zgodą z [105]. Copyright © 2018, American Chemical Society.</i>	90
Rysunek VI.4	<i>Widmo kompleksu PrP^C-Cu(II) (23-231) porównane do widma kompleksu Cu(II)-ftalocyjanianu i folii miedzianej. Insert przedstawia zbliżenie na rejon krawędzi i przejścia 1s -> 4p oraz II pochodne. Przerywanymi liniami zaznaczono położenie krawędzi absorpcji według miejsc zerowych II pochodnych widm absorpcyjnych.</i>	94
Rysunek VI.5	<i>Struktura stanów elektronowych w kompleksie Cu(II): A – bez transferu ładunku w stanie podstawowym; B – wzbudzenie jonu Cu(II) i powstanie wakancji w stanie 1s; C – transfer ładunku w wyniku relaksacji stanów 3d Cu(II).</i>	95
Rysunek VI.6	<i>Wyniki optymalizacji struktur zawierających Cu(II) pomocą pola siłowego UFF: A – kompleksu PrP^C-Cu(II) (23-106) i B – His₄-Cu(II) oraz funkcje RDF z uwzględnieniem wkładu poszczególnych pierwiastków dla: C - PrP^C-Cu(II) i D - B – His₄-Cu(II) oraz całkowite funkcje RDF dla obu modeli kompleksów Cu(II). Na rysunkach A-B, oznaczenia kolorów odpowiadają</i>	97

- typom atomów: C – szary, N – niebieski, O – czerwony, H – biały, Cu – pomarańczowy.
- Rysunek VI.7 Zależność osłabienia fluorescencji w próbce od grubości próbki z ilością jonów Cu(II) przyłączonych do białka PrP^C jako parametrem. Inset przedstawia wpływ stechiometrii kompleksu PrP^C-Cu(II) na wartość współczynnika absorpcji dla energii 8046,3 eV. 100
- Rysunek VI.8 A – Zależność wartości współczynnika absorpcji od energii padającego promieniowania X wyznaczona z tablic NIST dla różnych stechiometrii wiązania Cu(II) przez białko PrP^C; B – Obliczone w programie FEFF widma XAS kompleksu PrP^C-Cu(II) znormalizowane przy założeniu różnych stechiometrii wiązania miedzi. Dla porównania skali energetycznej, na obu rysunkach pokazano widmo eksperymentalne kompleksu. Przerywana pionowa linia oznacza energie, dla których znormalizowano obliczone widma. 101
- Rysunek VI.9 Widma obliczone ab-initio w programie FEFF przed i po korekcje samoabsorpcji porównane do danych eksperymentalnych: A – kompleks PrP^C-Cu(II); B – kompleks His₄-Cu(II). 102
- Rysunek VI.10 Wyniki dopasowania kombinacji liniowej dwóch modeli teoretycznych do eksperymentalnego widma XAS kompleksu PrP^C-Cu(II) (23-231) zmierzonego przy krawędzi K miedzi. Dolny wykres pokazuje różnicę między dopasowanym widmem wypadkowym (zielone), a doświadczalnym (czarne). 103
- Rysunek VI.11 Wzory strukturalne referencje organicznych użytych w trakcie pomiarów XAS przy krawędzi K Cu próbek ciekłych kompleksu PrP^C-Cu(II): a) Cu(II)-ftalocyjanian; b) Cu(II)-L-Histydyna. 105
- Rysunek VI.12 Widma XAS kompleksu PrP^C-Cu(II) (23-231) otrzymane podczas pomiarów przy krawędzi K miedzi. Pionowa linia orientacyjnie pokazuje obszar przejść 1s->4p + LMCT. 107
- Rysunek VI.13 Wyniki obliczeń widm ab-initio oraz funkcji DOS dla związków referencyjnych przy krawędzi K Cu w programie FEFF: A – kompleks Cu(II)-ftalocyjanian x 2H₂O; B - kompleks Cu(II)-ftalocyjanian; C - kompleks Cu(II)-L-Histydyna; D - kompleks Cu(II)-ftalocyjanian x H₂O; CuSO_{4aq}. 108

- Rysunek VI.14 *Zoptymalizowane metodą DFT i użyte w dalszej analizie struktury kompleksu: A) PrP^C-Cu(II) a; B) PrP^C-Cu(II) b oraz funkcje RDF z uwzględnieniem wkładu poszczególnych pierwiastków dla: C - PrP^C-Cu(II) a i D - B PrP^C-Cu(II) b oraz całkowite funkcje RDF dla obu modeli kompleksów Cu(II). Na rysunkach A-B, oznaczenia kolorów odpowiadają typom atomów: C – szary, N – niebieski, O – czerwony, H – biały, Cu – pomarańczowy.* 110
- Rysunek VI.15 *Wyniki dopasowania kombinacji liniowej dwóch modeli teoretycznych: PrP^C-Cu(II) a oraz PrP^C-Cu(II) b i widma Cu(II)-Acc₂ do eksperymentalnego widma XAS kompleksu PrP^C-Cu(II) (23-231) zmierzonego przy krawędzi K miedzi. Dolny wykres pokazuje różnicę między dopasowanym widmem wypadkowym (zielone), a doświadczalnym (czarne).* 112
- Rysunek VI.16 *Widma ab-initio XAS kompleksów A – PrP^C-Cu(II) a oraz B – PrP^C-Cu(II) b wraz z funkcjami DOS.* 114
- Rysunek VI.17 *Porównanie obsadzenia orbitali atomowych w kompleksach PrP^C-Cu(II) a oraz PrP^C-Cu(II) b. Transfer elektronów z pierścieni imidazolowych zapełnia orbitale na powłoce 4p Cu (szare tło).* 115
- Rysunek VI.18 *Relacje pomiędzy intensywnościami pików odpowiadających przejściu 1s -> 4p + LMCT oraz krawędzi absorpcji (1s -> 4p) i pikowi przedkrawędziowego (1s -> 3d). Zależność została pokazana dla wszystkich zmierzonych związków referencyjnych, próbki kompleksu PrP^C-Cu(II) oraz, dla porównania uwzględnione zostały także obliczone modelowe struktury PrP^C-Cu(II) a oraz b.* 117
- Rysunek VI.19 *Odtworzenie widma XAS poprzez dopasowanie do niego pików w formie funkcji Gaussa oraz funkcji skokowej arcus tangens. Wartości przypisane kolorom na wykresie odpowiadają maksimum dopasowanych funkcji.* 118

Rozdział VII

- Rysunek VII.1 *Przykładowe sposoby koordynowania atomu Cr przez pierścienie aromatyczne [173].* 123

Rysunek VII.2	<i>Schematy struktur zorganizowanych, tworzonych przez fosfolipidy: A – monowarstwa; B – dwuwarstwa; C – wielowarstwa, tu: czterowarstwa; D – liposom; E – micella.</i>	125
Rysunek VII.3	<i>Etap dializy próbek poddanych działaniu Cr(VI): A – Schemat układu do dializy próbek; B – zdjęcie dializowanej próbki przed pierwszą wymianą dializatu; C – końcowy etap dializy (19 godzina).</i>	129
Rysunek VII.4	<i>A – Widok na wnętrze hutchu pomiarowego linii BM-25A w ESRF; B – kriostat helowy do pomiarów próbek stałych w 10 K z przygotowany do pomiaru; C – układ do pomiaru próbek ciekłych.</i>	130
Rysunek VII.5	<i>A – Widok na spektrometr von Hamosa na linii P64 w DESY; B – Zbliżenie na układ pomiarowy w momencie dokonywania skanów widm XANES przy użyciu detektora PIPS (zaznaczony strzałką na rysunku).</i>	131
Rysunek VII.6	<i>A – pasma w widmie FTIR, charakterystyczne dla błon lipidowych. Przerywaną linią oznaczono pierwotne położenie pasm $\nu_s(\text{CH}_2)$ i $\nu_{as}(\text{CH}_2)$; B – maksima pasma $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ w funkcji temperatury oraz dopasowana do nich funkcja sigmoidalna. Przerywana pionowa linia pokazuje punkt przegięcia sigmoidy równy T_C.</i>	134
Rysunek VII.7	<i>Wyniki pomiarów XRD próbek liposomów przed i po poddaniu ich działaniu Cr(VI): A – grupa zawierająca mało DOPE (DMPC i DMPC:DOPE 100:1); B – grupa zawierająca dużą frakcję DOPE (DMPC:DOPE 10:1, DMPC:DOPE 5:1 oraz DMPC:DOPE 1:1). Szare tło i numery odpowiadają obszarom charakterystycznym, wyróżnionym na podstawie próbek liposomowych nie poddanych działaniu Cr(VI).</i>	135
Rysunek VII.8	<i>Wyniki pomiarów XAS próbek liposomów po poddaniu ich działaniu Cr(VI) oraz próbek referencyjnych: A – widma XAS z zaznaczonym obszarem przedkrawędziowym; B – zbliżenie na obszar przedkrawędziowy zaznaczony w (A). Szarym tłem wyróżniony został pik przedkrawędziowy. Czarna strzałka pokazuje przesunięcie krawędzi absorpcji między widmami K2Cr2O7 i DMPC:DOPE 1:1; C – Wykres obrazujący zmienność</i>	138

- wysokości i powierzchni pod pikiem przedkrawędziowym oraz położenia krawędzi absorpcji.
- Rysunek VII.9 *Krzywa kalibracyjna położenia krawędzi – stopień utlenienia (czerwona linia) oraz położenia krawędzi absorpcji w widmach liposomów (punkty koloru niebieskiego). Krzywa została sporządzona na podstawie widm XAS związków referencyjnych (punkty koloru czarnego).* 140
- Rysunek VII.10 *Wyniki dopasowania widm XAS DMPC:DOPE 1:1 oraz $K_2Cr_2O_7$ do pozostałych widm liposomów: A – DMPC; B – DMPC:DOPE 100:1; C – DMPC:DOPE 10:1; D – DMPC:DOPE 5:1.* 140
- Rysunek VII.11 *Widma różnicowe XAS próbek wodnych (górze) i w formie pastylek. Intensywne widma pastylek zostały narysowane linią półprzezroczystą dla zachowania przejrzystości rysunku.* 142
- Rysunek VII.12 *Poszczególne etapy analizy widm XRF oraz przykładowe wyniki pomiarów: A – krzywa kalibracyjna energia – kanał; B – krzywa kalibracyjna zliczenia – stężenie; C – widma XRF próbek referencyjnych $K_2Cr_2O_7$, $CrCl_3 \cdot 5H_2O$, Cr_2O_3 ; D – przykładowe widma XRF dla: kaptonu DMPC + Cr oraz DMPC:DOPE 5:1 + Cr; E – widmo różnicowe DMPC – kapton (górze) i składowe widma (dół); F – widmo różnicowe DMPC:DOPE 5:1 – kapton (górze) i składowe widma (dół).* 143
- Rysunek VII.13 *Przykład zdjęć, które posłużyły do obliczenia współczynnika C_{corr} : A – zdjęcie pastylki Cr_2O_3 ; B – zdjęcie pastylki DMPC:DOPE 100:1 + Cr; C – obraz binarny pastylki Cr_2O_3 ; D – obraz binarny pastylki DMPC:DOPE 100:1 + Cr.* 146
- Rysunek VII.14 *Połączone wyniki pomiarów XAS i XRF, obrazujące zmiany zawartości Cr(VI), Cr(IV) oraz całkowitego stężenia Cr w liposomach w funkcji ilości DOPE w błonach lipidowych.* 147
- Rysunek VII.15 *Model oddziaływania Cr(VI) z błoną. Przy braku ruchu wewnątrz błony Cr(VI) nie może się zredukować. Gdy błona ma charakter półpłynny, wiązania $-HC=CH-$ mogą stać się celem utleniania przez Cr(VI). Proces może się powtórzyć i doprowadzić do powstania kanału wodnego.* 148
- Rysunek VII.16 *Wycięcie rejonu piku przedkrawędziowego z map RXES na przykładzie mapy dla DMPC:DOPE 1:1 + Cr: A – pełna, mapa RXES z zaznaczonymi charakterystycznymi obszarami (kolor* 150

- biały) oraz rejonem wycięcia piku przedkrawędziowego (czerwony kolor); B – wycięty rejon piku przedkrawędziowego. Refleks piku elastycznego jest widoczny w widmach XAS, jako tzw. „glitch”.
- Rysunek VII.17 *Mapy RXES w obszarze piku przedkrawędziowego dla próbek: A – K₂Cr₂O₇; B – DMPC +Cr; C – DMPC:DOPE 10:1 +Cr; D – DMPC:DOPE 1:1 +Cr. Linie przerywane o kolorach czerwonym, białym i czarnym oznaczają miejsca wycięć w mapach RXES przy energiach 5993 eV, 5990,5 eV oraz 5946,5 eV. Linie kropkowane w tych samych kolorach oznaczają zasięg wycięć.* 151
- Rysunek VII.18 *Mapy RXES w obszarze piku przedkrawędziowego dla próbek referencyjnych: A – Cr₂O₃; B – Cr₂O₃ o stężeniu 15 %; C – Cr₂(SO₄)₃; D – CrCl₃; E – CrF₃; F – (C₆H₆)Cr(CO)₃.* 152
- Rysunek VII.19 *Krzywa kalibracyjna położenie krawędzi – stopień utlenienia (kolor czerwony) oraz położenia krawędzi absorpcji w widmach liposomów (punkty koloru niebieskiego). Krzywa została sporządzona na podstawie widm XAS związków referencyjnych (punkty koloru czarnego).* 153
- Rysunek VII.20 *Nierezonansowe widma XES wszystkich próbek: A – widma Kβ XES związków referencyjnych; B – widma Kβ XES próbek liposomów. Zmierzone próbki liposomów zostały zestawione z referencjami Cr₂O₃ (Cr(III)) oraz K₂Cr₂O₇ (Cr(VI)); C – zbliżenie na rejon v_{2c} widm XES próbek referencyjnych; D – zbliżenie na rejon v_{2c} widm XES próbek liposomów.* 154
- Rysunek VII.21 *Nierezonansowe widma XES i XAS oraz widma ab-initio dla próbek: A – Cr₂O₃ (Cr(III)) oraz B – K₂Cr₂O₇ (Cr(VI)). Na obu rysunkach czarne strzałki wskazują elementy widma doświadczalnego, które nie zostały poprawnie zidentyfikowane przez algorytm FMS. Linia ciągła oznacza elektronowe stany obsadzone, natomiast linia przerywana oznacza stany nieobsadzone.* 156
- Rysunek VII.22 *Model wiązania Cr błonie lipidowej obejmujący trzy różne atomy Cr i dwa miejsca wiążące w łańcuchu alifatycznym fosfolipidów (1) oraz w części hydrofilowej fosfolipidów (2). Miejsce wiążące Cr w części alifatycznej zawiera dwa atomy Cr oznaczone a i b.* 157

- Rysunek VII.23 *A – Porównanie widm XAS eksperymentalnego i otrzymanego w kombinacji liniowej oraz widm ab-initio obu miejsc wiążących Cr z Rys. VII. 21; B – Porównanie widm kombinacji liniowej widm ab-initio obszaru $K\beta_{1,3}$ wykonanej według wag kombinacji liniowej z rysunku A i wyniku doświadczalnego. Widmo miejsca wiążącego nr 1 otrzymano obliczając widma XAS atomów a i b, a następnie łącząc wyniki w stosunku 1:1. Inset przedstawia funkcje DOS typu p odpowiadające poszczególnym pikom widocznym na wypadkowym widmie. C – widmo ab-initio XAS miejsca wiążącego Cr nr 1 wraz z istotnymi funkcjami DOS; D – widmo ab-initio XAS miejsca wiążącego Cr nr 2 wraz z funkcjami DOS mającymi znaczny wkład do widma.* 159
- Rysunek VII.24 *Różnicowe mapy Δ RXES dla: A – DMPC +Cr – $K_2Cr_2O_7$; B – DMPC:DOPE 100:1 +Cr – $K_2Cr_2O_7$; C – DMPC:DOPE 1:1 +Cr – $K_2Cr_2O_7$. Linie przerywane o kolorach granatowym, zielonym i fioletowym oznaczają miejsca wycięć w mapach RXES przy energiach 5993 eV, 5990,5 eV oraz 5946,5 eV. Linie kropkowane w tych samych kolorach oznaczają zasięg wycięć.* 161
- Rysunek VII.25 *Wycięcia z map: A – Δ RXES wykonane wzdłuż energii emisji, szerokość wycięcia 2 eV dla energii padającej równej 5993 eV; B – RXES wykonane wzdłuż energii emisji, szerokość wycięcia 2 eV dla energii padającej równej 5993 eV.* 162
- Rysunek VII.26 *Wycięcia z map: A – Δ RXES wykonane wzdłuż energii padającej, szerokość wycięcia 1,5 eV dla energii emisji równej 5946,5 eV; B – RXES wykonane wzdłuż energii padającej, szerokość wycięcia 1,5 eV dla energii emisji równej 5946,5 eV.* 163
- Rysunek VII.27 *Wycięcia z map: A – Δ RXES wykonane wzdłuż energii emisji, szerokość wycięcia 1,5 eV dla energii emisji równej 5990,5 eV; B – RXES wykonane wzdłuż energii emisji, szerokość wycięcia 1,5 eV dla energii emisji równej 5990,5 eV.* 163
- Rysunek VII.28 *A – Widmo różnicowe DMPC +Cr – $K_2Cr_2O_7$ oraz takie samo widmo obliczone teoretycznie; B – Widmo różnicowe DMPC:DOPE 1:1 +Cr – $K_2Cr_2O_7$ oraz takie samo widmo obliczone teoretycznie.* 164
- Rysunek VII.29 *A – widma ab-initio i funkcje DOS dla dwuatomowego modelu wiązania Cr w miejscu wiążącym nr 1 z Rys. VII. 22; B – widma* 165

ab-initio i funkcje DOS dla CrPO_4 odpowiadające miejscu wiążącemu nr 2 z Rys. VII. 22; C – wypadkowe widmo *ab-initio* i funkcje DOS. Linie przerywane oznaczają stany nieobsadzone. Wszystkie widma na rysunkach A i B zostały przeskalowane zgodnie z wynikiem kombinacji liniowej widm XAS z Rys. VII. 23.

Rysunek VII.30 A – Mapa RXES DMPC +Cr otrzymana teoretycznie oraz B – 166
zbliżenie na obszar piku przedkrawędziowego. W celu porównania skopiowano do podpunktów (C) i (D) zawartość Rys. VII. 16; C – mapa RXES próbki DMPC:DOPE 1:1 +Cr; D – wycięty obszar piku przedkrawędziowego.

SPIS TABEL

Rozdział VI

Tabela VI.1	<i>Wyniki przypisania odległości międzyplaszczynowych do refleksów oznaczonych na Rys. VI. 4 A-B.</i>	136
Tabela VI.2	<i>Wyniki dopasowania liniowego widm XAS DMPC:DOPE 1:1 oraz $K_2Cr_2O_7$ do widm XAS DMPC, DMPC:DOPE 100:1, DMPC:DOPE 10:1 oraz DMPC:DOPE 5:1.</i>	141
Tabela VI.3	<i>Wyniki dopasowania liniowego widm XAS DMPC:DOPE 1:1 (pastylka) oraz $K_2Cr_2O_7$ do widm XAS próbek wodnych DMPC, DMPC:DOPE 100:1, DMPC:DOPE 10:1 oraz DMPC:DOPE 5:1.</i>	142

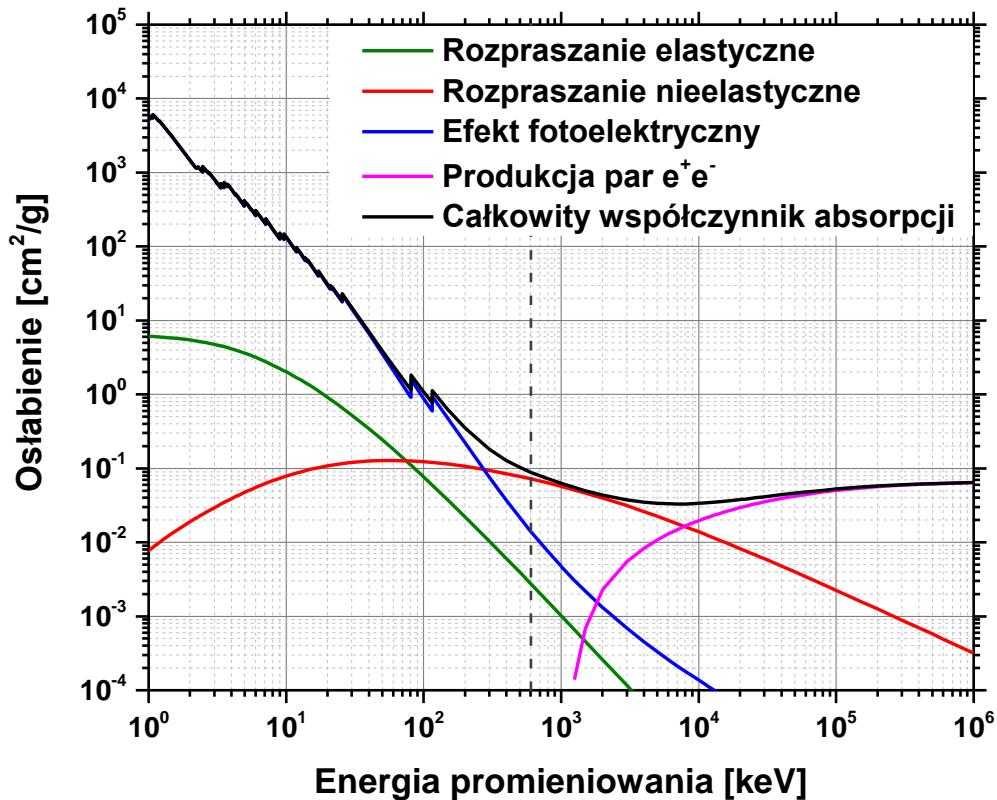
I. Promieniowanie rentgenowskie

I. 1 Podstawowe własności promieniowania rentgenowskiego

Promieniowanie rentgenowskie (promieniowanie X) jest to fala elektromagnetyczna o energiach od ok 200 eV do 0,5 MeV. Odpowiada to długościom fali równym od 62 Å do 0,0025 Å. W zależności od energii opisywanego promieniowania X, mówi się o miękkim promieniowaniu X (200 eV – 2000 eV) [1], delikatnym (ang. *tender*, 2000 eV – 5000 eV) [2] oraz twardym promieniowaniu X (>5000 eV) [2]. W widmie elektromagnetycznym, promieniowanie X od strony niskich energii ograniczone jest przez promieniowaniem UV, natomiast od strony wysokich energii, przez promieniowanie gamma.

Promieniowanie rentgenowskie może powstawać naturalnie lub sztucznie. Do naturalnych źródeł należą rozpady promieniotwórcze i promieniowanie kosmiczne. Sztuczne źródła promieniowania rentgenowskiego dzielą się na dwa typy: laboratoryjne oraz typu LSRF (ang. *Large Scale Research Facilities*, pol. Duże Ośrodki Badawcze, DOB). Do konwencjonalnych należy na przykład lampa rentgenowska [3].

Promieniowanie rentgenowskie może oddziaływać z materią, którą napotyka na swojej drodze. Skala i natura zjawiska oddziaływania jest zdeterminowana przez energię kwantów promieniowania X oraz masę i liczbę atomową pierwiastków, z którymi promieniowanie oddziałuje. Na oddziaływanie promieniowania X z materią składają się: efekt fotoelektryczny, rozpraszanie elastyczne: Rayleigha i Thomsona, nieelastyczne – Comptona oraz tworzenie par elektron – antyelektron (pozyton). Przekrój czynny na wymienione efekty silnie zależy od energii padającego promieniowania. Dla najniższych energii kwantów rentgenowskich zachodzi głównie efekt fotoelektryczny, który polega na przekazie całej energii fotonów silnie związanych elektronom. Z rozpraszaniem elastycznym (koherentnym) ma się do czynienia, gdy fotony nie zmieniają swojej energii podczas oddziaływania i zachodzi ono zarówno na jądrach atomowych jak i na silnie związanych elektronach. Rozpraszanie nieelastyczne promieniowania X, czyli tak zwany efekt Comptona może występować zarówno w oddziaływaniach z elektronami swobodnymi jak i słabo związanymi elektronami walencyjnymi. W wyniku takiego oddziaływania następuje przekaz energii z fotonu do elektronu, a foton zmienia swój pęd. Ostatnim rodzajem oddziaływaniem jest tworzenie się par cząstka-antycząstka w polu elektrycznym elektronów lub polu magnetycznym jąder atomów ośrodka. Dolną granicą energetyczną zachodzenia tego efektu jest równowartość masy



Rysunek 1. 1 Wykres obrazujący wkłady poszczególnych oddziaływań do całkowitego masowego współczynnika absorpcji. W celu wizualizacji zależności wybrano równomolową mieszaninę pierwiastków: Na, S, Ti, Cr, Fe, Cu, Zn, Ag, Au, U. Pionowa przerywana linia wskazuje umowną granicę między promieniowaniem rentgenowskim, a gamma. Obliczenia wykonano na podstawie tablic National Institute of Standards and Technology (NIST) [67].

spoczynkowej dwóch elektronów – 1022 keV. W niniejszej pracy, opisane zostaną efekty mające największy wkład w zakresie energetycznym równym 200 eV – 10000 eV. Na Rys. 1.1 pokazane są całkowite przekroje czynne dla wymienionych wyżej oddziaływań. Jak widać, w obszarze zainteresowania dominujące są: efekt fotoelektryczny oraz rozpraszania elastyczne i nieelastyczne.

Przekrój czynny. Wartością charakteryzującą prawdopodobieństwo wystąpienia danego oddziaływania jest przekrój czynny. Klasycznie, przekrój czynny na absorpcję jest zdefiniowany przez równanie różniczkowe opisujące zmianę natężenia strumienia cząstek lub fotonów (Φ) w elemencie grubość dx :

$$\frac{d\Phi(x)}{dx} = -N\sigma\Phi \quad (1)$$

gdzie: N – liczba centrów absorbujących na jednostkę powierzchni $\left[\frac{1}{\text{cm}^2}\right]$;

σ – przekrój czynny w $\left[\frac{cm^2}{g}\right]$.

Po scałkowaniu powyższego wzoru stronami w zakresie całkowitej grubości absorbera (d) i z warunkiem początkowym $\Phi(0) = \Phi_0$ otrzymuje się prawo Lamberta-Berra:

$$\Phi = \Phi_0 e^{-N\sigma d} \quad (2)$$

Przekrój czynny definiuje się jako stosunek liczby cząstek lub fotonów rozproszonych (lub zaabsorbowanych) w objętości tarczy do liczby wszystkich padających, podzielony przez gęstość centrów absorbujących na jednostkę powierzchni. Jest to więc prawdopodobieństwo wystąpienia danego zjawiska na jednostkę powierzchni. W przypadku gdy przekrój czynny zmienia się w funkcji jednej lub kilku obserwabli mamy do czynienia z różniczkowym przekrojem czynnym. Z reguły występują przekroje czynne zależne od energii padających cząstek (fotonów) lub od kątów padania i rozpraszania. Alternatywnie dla przekroju czynnego obecnego we wzorze (2), można zdefiniować równanie:

$$I = I_0 e^{-\mu d} \quad (3)$$

gdzie: I – kolejno natężenie wiązki promieniowania po przejściu przez obiekt o grubości d ;

I_0 – natężenie padającej wiązki;

μ – liniowy współczynnik osłabienia promieniowania.

Współczynnik osłabienia związany jest ściśle z przekrojem czynnym na absorpcję fotonu:

$$\sigma = \frac{\mu}{\rho_m} \frac{m_a}{N_a} \quad (4)$$

gdzie: $\frac{\mu}{\rho_m} = \mu_m$ – masowy współczynnik osłabienia promieniowania;

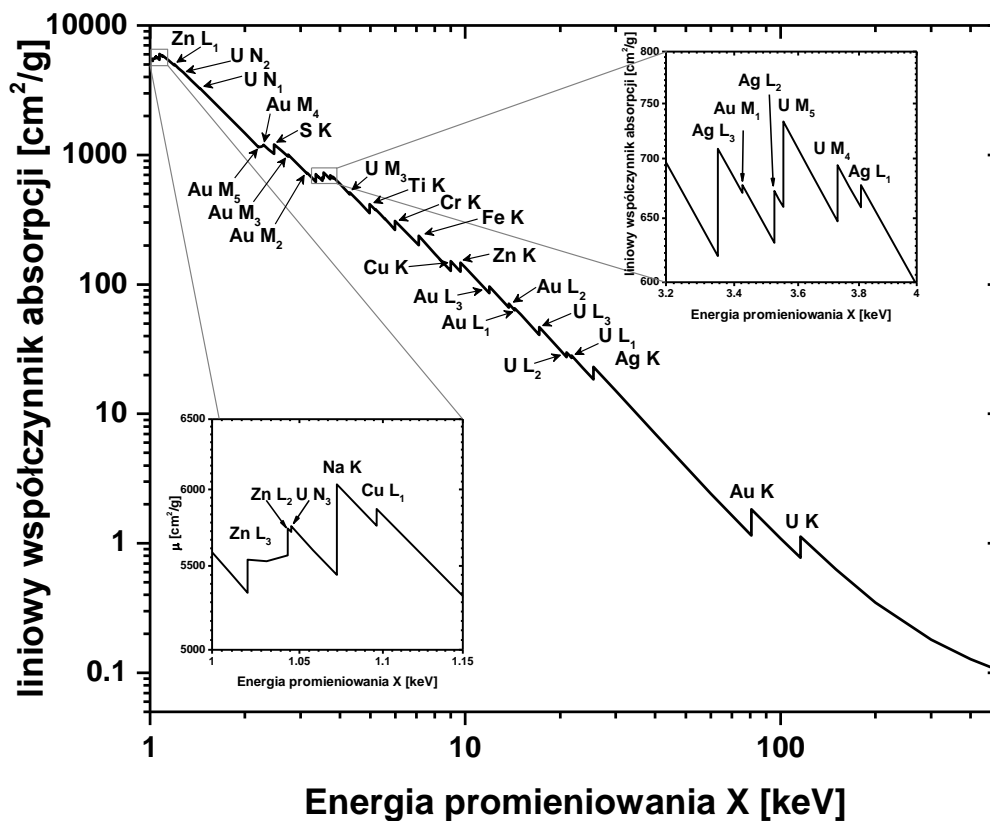
ρ_m – gęstość masy;

m_a – masa molowa atomów absorbera;

N_a – liczba Avogadro.

Z tej równoważności wynika także możliwość zamiennego stosowania wartości μ i σ z dokładnością do stałej szczególnie w przypadku, gdy rozpatruje się pojedynczy pierwiastek. Na współczynnik osłabienia składają się wszystkie oddziaływania pokazane na Rys. 1.1. i spełniają one zasadę addytywności.

Efekt fotoelektryczny. Wraz z rosnącą energią kwanty promieniowania X stają się coraz bardziej przenikliwe i coraz słabiej oddziałują z materią. W energetycznym widmie promieniowania rentgenowskiego można zaobserwować charakterystyczne tzw. krawędzie absorpcji. Krawędź absorpcji pojawia się, gdy energia padającego promieniowania rentgenowskiego staje się równa energii wiązania elektronu na danej powłoce elektronowej.



Rysunek 1. 2 Krawędzie absorpcji wyznaczone dla mieszaniny pierwiastków: Na, S, Ti, Cr, Fe, Cu, Zn, Ag, Au, U w stosunku równomolowym każdy. Obliczenia wykonano na podstawie tablic National Institute of Standards and Technology (NIST) [67].

Krawędzie absorpcji przyjęło się nazywać tak samo jak powłoki elektronowe, kolejno od najniższej: K, L, M, N.... Przykład obecności krawędzi absorpcji pokazany jest na Rys. 1.2.

Absorpcja fotoelektryczna polega na wybiciu elektronu związanego w atomie (fotoelektronu) z jego powłoki i zachodzi, gdy spełniona jest zasada zachowania energii:

$$h\nu_e = E_f - W \quad (5)$$

gdzie: $h\nu_e$ – energia fotoelektronu;

E_f – energia wiązania elektronu;

W – praca wyjścia.

Klasycznie, przekrój czynny na absorpcję fotoelektryczną zależy od energii padającego fotoelektronu i liczby atomowej pierwiastka, Z :

$$\sigma_{abs} = \sigma_0 \frac{Z^5}{(h\nu)^3} \quad (6)$$

gdzie: σ_0 – stały współczynnik proporcjonalności.

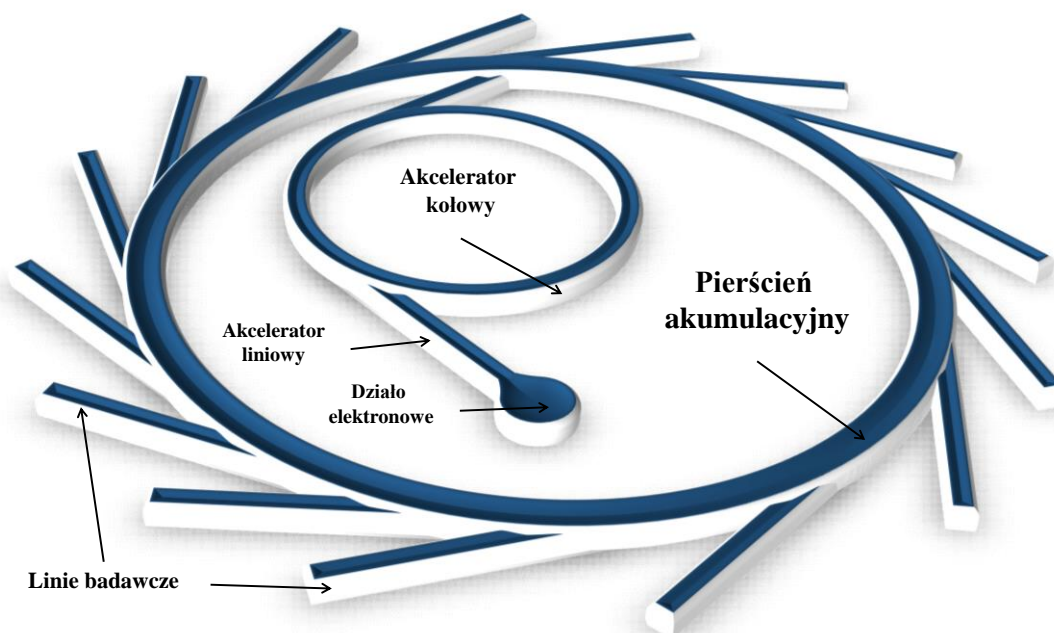
W wyniku zaabsorbowania kwantu promieniowania X elektron zostaje wybity ze swojej powłoki elektronowej i powstaje wakancja w powłoce rdzenia atomowego, tzw. dziura rdzeniowa. Taki stan wzbudzony ma określony czas życia z reguły od ok. ułamków

femtosekund do kilku femtosekund i jego relaksacja może zachodzić w dwojaki sposób. W pierwszym z nich elektron z wyższej powłoki zapędnia dziurę, pozbywając się nadmiaru energii w postaci emisji kwantu promieniowania X o charakterystycznej energii. Zjawisko to nazywa się fluorescencją rentgenowską. Takie kwanty promieniowania mają ściśle określoną, łatwą do identyfikacji energię, parzystość i są używane w spektroskopii rentgenowskiej. Drugi mechanizm deekscytacji, charakterystyczny głównie dla atomów lekkich, to emisja elektronów w procesie emisji elektronów Augera. W tej sytuacji podczas zapędniania dziury rdzeniowej przez elektron z wyższej powłoki, emitowany jest jeszcze jeden elektron z powłoki walencyjnej. Warto wspomnieć, że może dojść do zapędnienia wakancji przez elektron z tej samej powłoki elektronowej, ale z wyższej podpowłoki z jednoczesną emisją elektronu z wyższej powłoki. Taki efekt nazywa się zjawiskiem Costera-Kroninga.

I. 2 Synchrontron jako źródło promieniowania X

A. Budowa synchrontronu [4,5]

Synchrontron jest źródłem promieniowania X wykorzystywanym głównie do celów naukowych. Schemat budowy synchrontronu III generacji pokazany jest na Rys. I. 3. Zasada działania synchrontronu polega na wzbudzaniu emisji promieniowania elektromagnetycznego



Rysunek 1. 3 Schemat synchrontronu III generacji z najważniejszymi elementami. W celu zachowania przejrzystości rysunku, nie zaznaczono na nim urządzeń wstawkowych oraz nadprzewodzących wnęk rezonansowych.

w wyniku oddziaływania silnym polem magnetycznym na relatywistyczne elektrony krążące w pierścieniu akumulacyjnym. Źródłem elektronów jest tak zwane działło elektronowe, czyli rozgrzany do około 2800 K drut wolframowy, z którego w przyspieszającym polu elektrycznym emitowane są termoelektrony. Następnie, elektrony te są przyspieszane. Najpierw są transportowane przez akcelerator liniowy, w którym osiągają energię kilkuset MeV, a następnie trafiają do małego akceleratora kołowego (przyspieszacza, ang. *booster*), gdzie osiągają docelową energię kilku GeV. Z przyspieszacza są transportowane do pierścienia akumulacyjnego, w którym krążą po orbicie kołowej i są poddawane oddziaływaniu zewnętrznego pola magnetycznego w magnesach zakrzywiających i tzw. urządzeniach wstawkowych (ang. *insertion devices*): wigglerach i undulatorach. Oddziałując z polem magnetycznym, elektrony tracą energię, która musi być regularnie uzupełniana. Do tego służą nadprzewodzące wnęki rezonansowe działające w zakresie fal radiowych (ang. *superconducting radio-frequency cavity*). W trakcie procesu uzupełniania energii elektronów, efektywnie około 15 % z nich odzyskuje docelową energię, natomiast reszta jest bezpowrotnie tracona. Powoduje to formowanie paczek elektronów (ang. *bunches*). Aby utrzymać stałe natężenie prądu w pierścieniu akumulacyjnym, elektrony muszą być ciągle uzupełniane. Obecnie coraz więcej synchrotronów pracuje w modzie *top-up*, który polega na częstym uzupełnianiu niewielkich strat elektronów w pierścieniu akumulacyjnym, dzięki czemu natężenie prądu pozostaje praktycznie bez zmian. Należy również zaznaczyć, że we wszystkich opisanych elementach synchrotronu, na drodze elektronów oraz wytworzonego promieniowania panuje wysoka próżnia.

B. Urządzenia wstawkowe i własności promieniowania synchrotronowego [4,5]

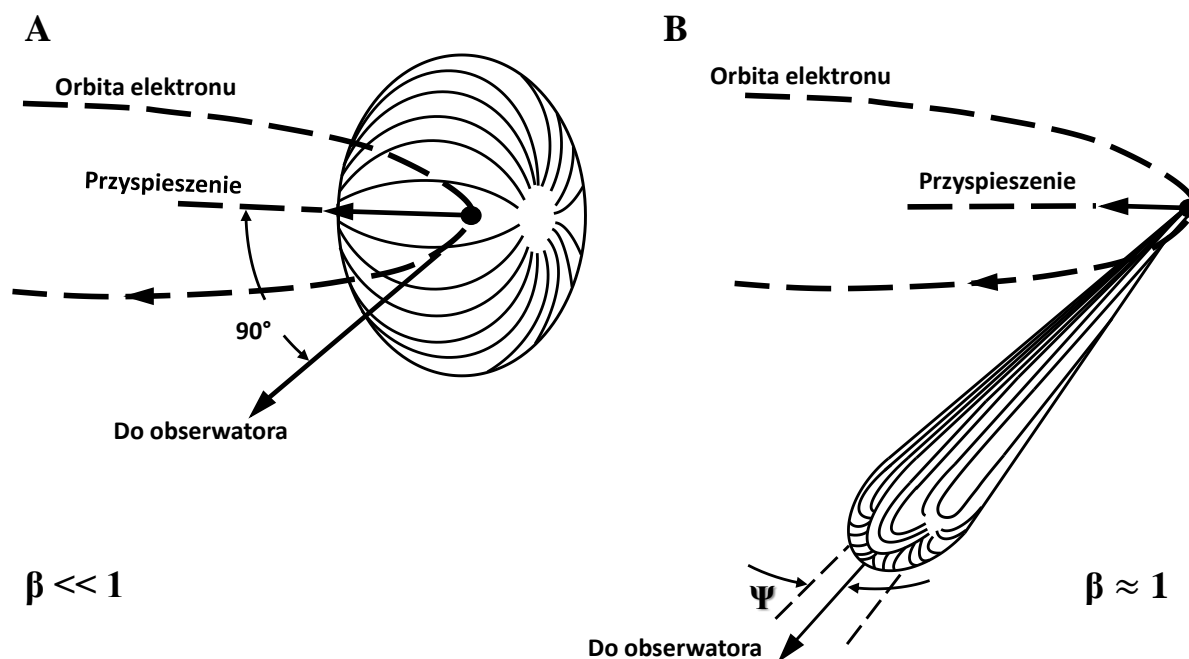
Promieniowanie synchrotronowe powstaje w magnesach zakrzywiających i urządzeniach wstawkowych w wyniku oddziaływania pola magnetycznego na relatywistyczne elektrony. Źródło synchrotronowe promieniowania X ma następujące cechy:

- Dużą intensywność, o 12 rzędów wielkości większą niż konwencjonalne źródła;
- Bardzo szeroki i ciągły zakres energetyczny: od podczerwieni, do „twardego” promieniowania X;
- Mały naturalny kąt kolimacji;
- Wysoki stopień polaryzacji;
- Dyskretną strukturę czasową;
- Duży strumień, świetlność i silną kolimację wiązki promieniowania;

- Dodatkowo, wymagana jest wysoka stabilność takiego źródła, co jest osiągnięte między innymi dzięki zachowaniu wysokiej próżni na całej drodze optycznej wiązki promieniowania.

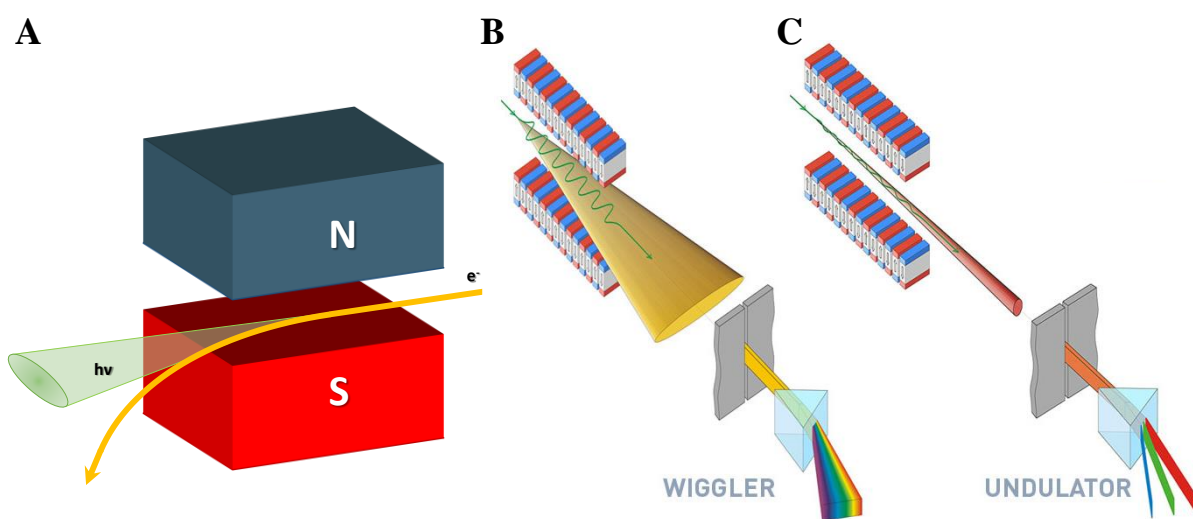
Poruszające się elektrony w polu magnetycznym emitują promieniowanie elektromagnetyczne o energii zależnej od intensywności pola i energii kinetycznej tych elektronów. W przypadku nierelatywistycznym stosunek β prędkości liniowej elektronów do prędkości światła c jest dużo mniejszy od 1. Wówczas elektrony w polu magnetycznym emitują promieniowanie elektromagnetyczne o kątowym rozkładzie podobnym do oscylującego dipola z maksimami intensywności skierowanymi prostopadle do płaszczyzny ruchu (Rys. I. 4 A). W przypadku, gdy prędkość liniowa elektronu jest zbliżona do c , $\beta \approx 1$, dominują efekty relatywistyczne. Profil emisji promieniowania elektromagnetycznego układa się w charakterystyczny stożek (Rys. I. 4 B), którego centrum jest skierowane w kierunku wektora ruchu elektronów. Kąt połówkowy rozwarcia stożka emisji Ψ jest proporcjonalny do wyrażenia $\sqrt{1 - \beta^2}$ [6] i dla elektronów o energii 1 GeV, wynosi $0,029^\circ$. Powstawanie Promieniowania synchrotronowego jest zatem efektem relatywistycznym.

Magnesy zakrzywiające spełniają podwójną funkcję. Po pierwsze zakrzywiają tor lotu wiązki elektronów w pierścieniu akumulacyjnym. Po drugie służą, jako źródło promieniowania synchrotronowego. Takie źródło można scharakteryzować parametrem krytycznej długości fali



Rysunek 1. 4 Schemat prezentujący emisję promieniowania elektromagnetycznego w polu magnetycznym przez elektrony A – nierelatywistyczne; B – relatywistyczne. Rysunek przerysowany z [6].

λ_c , która zależy jedynie od parametrów technicznych pierścienia akumulacyjnego i energii elektronów. Powyżej tej wartości generowane jest 50 % mocy strumienia fotonów w magnesie. Schemat działania magnesu zakrzywiającego pokazany jest na Rys. I. 5 A. Urządzenia wstawkowe dzieli się na dwa rodzaje: wiggler i undulator, pokazane schematycznie na Rys. I. 5 B–C. Oba te urządzenia składają się z naprzemiennie ułożonych magnesów nadprzewodzących, których pole magnetyczne zmusza elektrony do sinusoidalnego drgania w płaszczyźnie urządzenia, wzdłuż linii prostej wyznaczającej wypadkową trasę wiązki. W efekcie, przy każdym drganiu emitowane jest promieniowanie elektromagnetyczne o zadanym kącie bryłowym emisji (wiązka przyjmuje formę stożka), które na końcu sumuje się w intensywną wiązkę promieniowania. O własnościach promieniowania wytworzonego przez urządzenia wstawkowe decydują parametry tych urządzeń: całkowita długość, odległość między magnesami, amplituda zmian pola magnetycznego oraz energia elektronów. Oba typy urządzeń emitują znacznie bardziej intensywne promieniowanie charakteryzujące się większym strumieniem promieniowania oraz świetlnością, zdefiniowaną jako strumień podzielony przez powierzchnię źródła oraz przez kąt bryłowy emisji. W wigglerze, podobnie jak w magnesie zakrzywiającym, promieniowanie powstałe w każdym drganiu dodaje się niekoherentnie, przez co intensywność wigglera, w porównaniu do magnesu zakrzywiającego różni się o czynnik N (definiuje on ilość par magnesów w wigglerze). Różnica między wigglerem i undulatorem jest dość subtelna. W undulatorze zakrzywienie toru lotu elektronów jest większe. Konstrukcja undulatora powoduje, iż drgania elektronów w płaszczyźnie urządzenia mają kąt mniejszy niż naturalny kąt emisji promieniowania. Promieniowanie



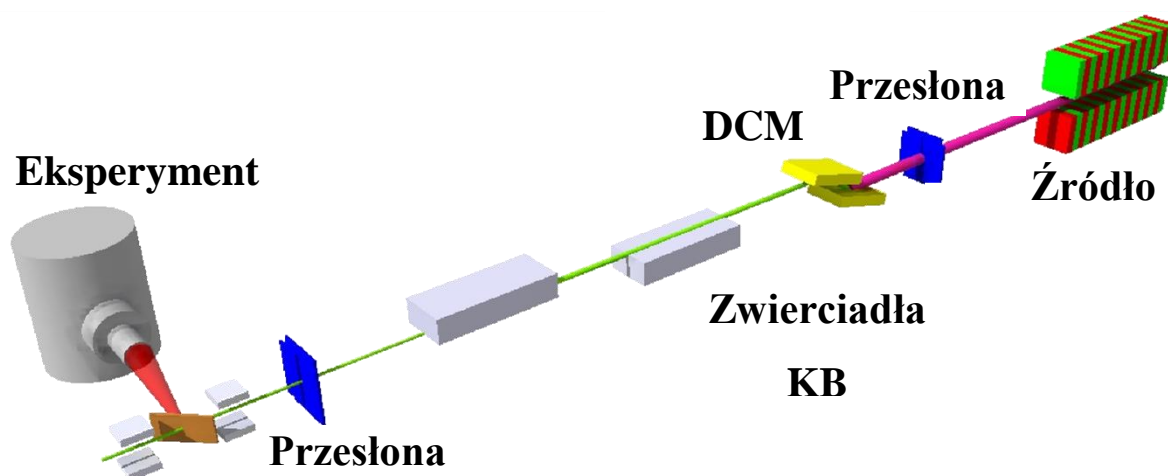
Rysunek 1. 5 Źródła promieniowania synchrotronowego: A – magnes zakrzywiający; B – wiggler; C – undulator. Rysunki B i C zaczerpnięto z [7].

wyemitowane w każdym drganiu, w różnych okresach tych drgań interferuje konstruktywnie ze sobą, tworząc spójną wiązkę promieniowania. W efekcie, undulator produkuje znacznie bardziej intensywne promieniowanie przy jednocześnie wyraźnie mniejszym kącie bryłowym, a intensywność jego promieniowania względem magnesu zakrzywiającego różni się o czynnik N^2 . Jednocześnie kąt rozwarcia stożka promieniowania jest mniejszy niż w wigglerze o czynnik \sqrt{N} . Ponadto undulator, jako jedyny zachowuje kolimację wytworzonego promieniowania w płaszczyźnie równoległej jak i prostopadłej do płaszczyzny orbity elektronu. Efektem zastosowania undulatora jest promieniowanie synchrotronowe o największej intensywności i jednocześnie relatywnie wąskim profilem energetycznym.

C. Budowa linii eksperymentalnej [8]

Każda linia eksperymentalna może zostać podzielona na część optyczną i eksperymentalną. W tym paragrafie opisane zostaną typowe rozwiązania stosowane w częściach optycznych linii eksperymentalnych dedykowanych pomiarom przy użyciu twardego, monochromatycznego promieniowania rentgenowskiego.

Cała optyka pozwalająca na koniec uzyskać monochromatyczną wiązkę promieniowania X, oparta jest na zjawisku Bragga. Podstawowe elementy tej optyki pokazane są na Rys. I. 6. Wiązka promieniowania jest formowana do odpowiednich rozmiarów przy pomocy szczelin. Szczeliny zapobiegają także propagacji promieniowania rozproszonego i są obecne na wielu etapach drogi optycznej wiązki. W celu oddzielenia kolejnych sekcji drogi optycznej wiązki promieniowania, na jej drodze ustawione są okienka ze słabo absorbujących materiałów takich jak beryl lub kapton. Okienka działają także jak filtry absorbujące



Rysunek 1. 6 Ogólny schemat optyki stosowanej na wiązce eksperymentalnej dedykowanej pomiarom w obszarze twardego promieniowania X. Schemat zaczerpnięty ze strony internetowej linii eksperymentalnej P64 na synchrotronie Petra III w DESY. [9]

niskoenergetyczną frakcję wiązki i redukującą moc dostarczaną na inne elementy optyczne. Aby uzyskać wiązkę promieniowania o możliwe wąskim profilu energetycznym stosuje się monochromatory. Najczęściej, stosuje się monochromatory zbudowane z dwóch kryształów Si lub Ge, ustawione równolegle względem siebie (ang. *Double Crystal Monochromator*, DCM). Proces monochromatyzacji wykorzystuje odbicie wiązki poprzez dyfrakcję, które zachodzi tylko jeżeli spełniony jest warunek Bragga. Takie rozwiązanie pozwala na wyeliminowanie długości fali nie spełniających warunku Bragga, jednakże w powstałej wiązce obecne są wyższe harmoniczne, spełniające również prawo Bragga. W DCM wykorzystuje się różne płaszczyzny kryształów, na przykład (111) lub (333) w zależności od docelowej energii wiązki. Za standard przyjęło się, aby rozdzielczość energetyczna monochromatora wynosiła co najmniej $\Delta E/E = 10^{-4}$. Następnym elementem optycznym są zwierciadła, które pełnią dwojaką rolę. Po pierwsze służą do skupienia wiązki w kierunku horyzontalnym i pionowym. Po drugie, zwierciadła działają jak filtr eliminując z odbitej wiązki wyższe harmoniczne, które powstają podczas monochromatyzacji wiązki. Optymalny układ to dwa zwierciadła Kirkpatricka-Baeza (KB) ustawione wzajemnie pod kątem 90° , a wiązka promieniowania pada na ich płaszczyzny pod kątem mniejszym niż kąt krytyczny zwierciadła. Są to kąty rzędu miliradianów, przez co zwierciadła te osiągają rozmiary rzędu metrów. Ponadto, aby skupić wiązkę i wyeliminować jej odkształcenia, zwierciadła mają z reguły kształt toroidalny lub cylindryczny. Najczęściej stosowanym materiałem jest Si lub SiO₂, który dodatkowo jest pokryty warstwami ciężkich metali np. Pt, Rh, Ni, Au w zależności od docelowego zakresu energii, przy których ma pracować stacja pomiarowa. Na przykład, wiązka używana na stacji pomiarowej P64 na synchrotronie Petra III w DESY ma źródło w postaci 2 metrowego undulatora i pracuje w zakresie 4 – 44 keV. W zależności od docelowej energii wymaganej w eksperymencie, DCM wykorzystuje płaszczyzny odbijające Si(111) lub Si(311). Eliminacja wyższych harmonicznych i skupienie wiązki zachodzi na dwóch lustrach Si pokrytych Pt i Rh. Oba lustra mają możliwość jednoczesnej eliminacji wyższych harmonicznych dla zakresów energii 4 keV - 10 keV, 9 keV - 20 keV, 14 keV - 25 keV oraz skupiania wiązki w zakresie energetycznym 4 keV – 25 keV. Jakość otrzymanej do eksperymentu wiązki silnie zależy od jakości użytych w monochromatorze kryształów oraz od jakości zwierciadeł.

II. Spektroskopia rentgenowska

„Spektroskopia” oznacza dosłownie „oglądanie widm” od łacińskiego słowa *spectrum* „zjawisko”, „obraz” i *specere* „zjawa”, „widmo” oraz od greckiego *skopein*, „oglądać”¹. Jest to więc nauka o powstawaniu, własnościach oraz interpretacji widm. Widmo to obraz promieniowania, dwuwymiarowa zależność pomiędzy obserwabłą definiującą dane promieniowanie (np. intensywność, przekrój czynny, liczba zliczeń), a energią lub komplementarną wartością fizyczną (np. długością fali, liczbą falową, częstotliwością). Spektroskopia rentgenowska zajmuje się analizą widm z zakresu promieniowania rentgenowskiego.

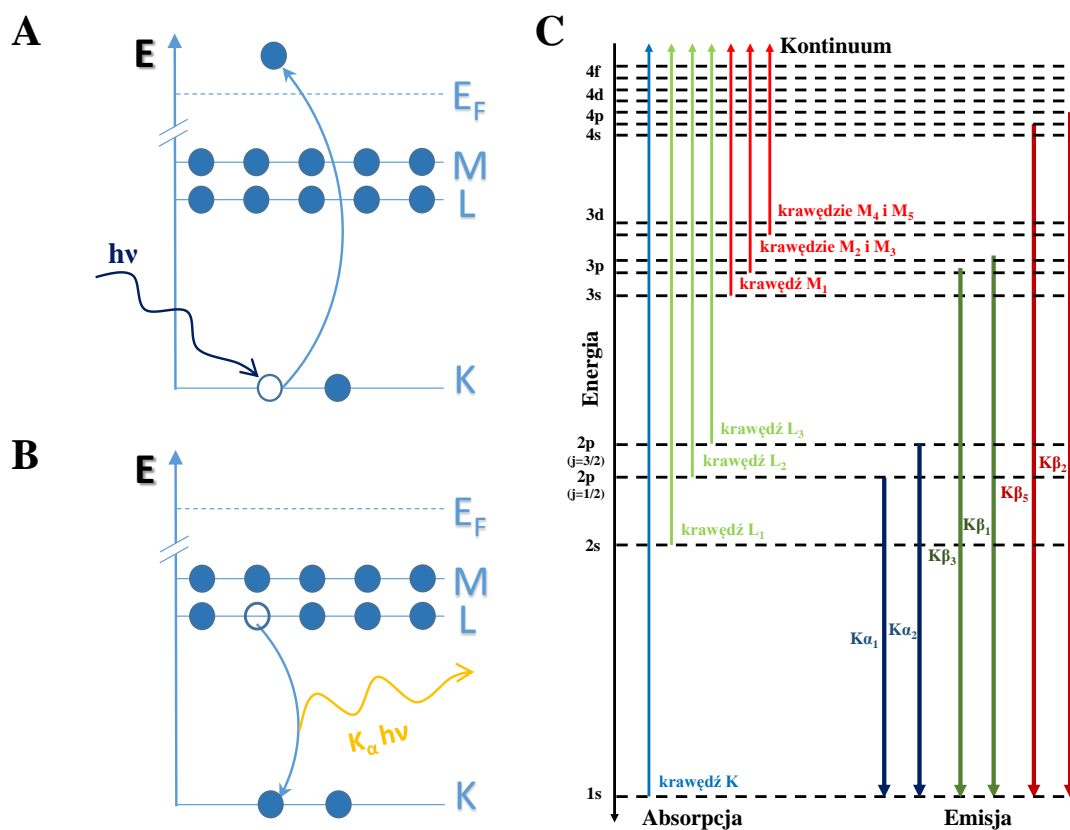
W Rozdziale I opisane zostały właściwości promieniowania rentgenowskiego oraz to, w jaki sposób oddziałuje ono z materią. Przekładają się one na unikatowe zastosowania spektroskopowe promieniowania X. W tym rozdziale opisane zostaną wykorzystane w niniejszej Pracy techniki spektroskopowe.

II. 1 Spektroskopia absorpcyjna promieniowania rentgenowskiego

A. Struktura przy krawędzi absorpcji

Spektroskopia rentgenowska, poprzez oddziaływanie promieniowania X z atomami umożliwia badanie struktury materii na poziomie atomowym oraz subatomowym. Najbardziej podstawowym sposobem oddziaływania promieniowania X z materią jest absorpcja promieniowania X i powiązana z nią Rentgenowska Spektroskopia Absorpcyjna (ang. *X-Ray Absorption Spectroscopy*, XAS). Absorpcja promieniowania X zachodzi wtedy, gdy energia padającego fotonu jest równa lub większa niż energia wiązania elektronu na danym poziomie energetycznym. Elektrony w atomie zostają wzbudzone przez promieniowanie X powyżej poziomu Fermiego atomu (Rys. II. 1 A), a następnie przy pomocy odpowiedniej metody detekcji, obserwuje się zmiany współczynnika absorpcji $\mu(E)$, wraz ze zmianą energii wzbudzającego promieniowania X, gdy wakancja w rdzeniu atomowym zostaje zapełniana przez elektron z wyższej powłoki. Poziom Fermiego jest to energia poziomu energetycznego ostatniego elektronu walencyjnego w atomie znajdującym się w temperaturze 0 K, przy warunku, że wszystkie poziomy poniżej są zapełnione, a powyżej wolne. Wzbudzenie może

¹ Na podstawie: Władysław Kopaliński, „Słownik wyrazów obcych i zwrotów obcojęzycznych pierwsze wydanie w Internecie”, dostęp: 25.05.2018, 15:30, adres: <http://www.sloownik-online.pl/index.php>



Rysunek II. 1 Schemat wzbudzenia stanu $1s$ w dowolnym atomie. Na początku promieniowanie o wysokiej energii pada na atom, następuje absorpcja kwantu promieniowania X i promocja elektronu na stan powyżej energii Fermiego (A). Wakancja w rdzeniu atomowym jest zapełniana przez elektron z wyższej powłoki przy czym emitowane jest charakterystyczne promieniowanie fluorescencji rentgenowskiej (B). Absorpcja oraz emisja zachodzą tylko z udziałem konkretnych poziomów energetycznych dozwolonych regułami wyboru (C). Na schemacie C zapełnienie dziury rdzeniowej zostało pokazane tylko dla stanu $1s$ (krawędź K).

następować ze stanów o głównej liczbie kwantowej 1, 2 a dla pierwiastków ciężkich także 3. Odpowiada to krawędziom absorpcji kolejno K, L oraz M. Przejściami elektronowymi rządzą kwantowe reguły wyboru dla przejść dipolowych: $\Delta l = \pm 1$, $\Delta j = 0, \pm 1$, gdzie l to orbitalna liczba kwantowa, a j to rzut całkowitego momentu pędu na oś kwantyzacji (całkowity moment pędu).

Wzbudzony atom może deekscytować na drodze dwóch głównych mechanizmów. Tak jak w przypadku przejść elektronowych zachodzących w wyniku absorpcji kwantu promieniowania X , oba mechanizmy deekscytacji są rządzone przez dipolowe reguły wyboru. W przypadku padającego twardego promieniowania X , gdy wakancja o energii E_1 w rdzeniu atomowym jest wypełniona przez elektron z wyższej powłoki o energii E_2 , zachodzi równoczesna emisja kwantu promieniowania X . Promieniowanie to jest obserwowane jako fluorescencja rentgenowska o energii równej $\Delta E = |E_1 - E_2|$ (Rys. II 1 B). Gdy padające

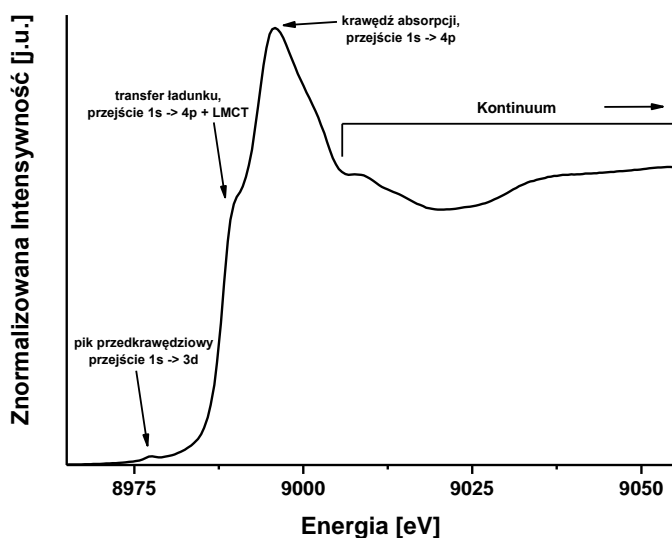
promieniowanie X jest miękkie, wówczas podczas zapelniania wakancji rdzeniowej elektronem z wyższej powłoki emitowany do Kontinuum jest dodatkowo jeszcze jeden elektron. Taki proces nazywa się efektem Augera. Oba zjawiska można wykorzystać do badania współczynnika absorpcji $\mu(E)$, jednakże efekt Augera wymaga innej metodologii eksperymentalnej niż detekcja fluorescencji. Wszystkie eksperymenty opisane w niniejszej Rozprawie zostały wykonane z wykorzystaniem detekcji fluorescencji promieniowania X dlatego też efekt Augera nie będzie omawiany.

Aby móc wykorzystać w pełni zalety techniki XAS, w pomiarach używa się Promieniowania Synchrotronowego (SR), które jest koherentne, charakteryzuje się dużą intensywnością, jest spolaryzowane i może być zmonochromatyzowane. Dzięki temu, że elektrony w atomach mają ściśle skwantowane poziomy energetyczne (Rys. II. 1 A-B), jest to metoda selektywna ze względu na badany rodzaj pierwiastków. Próbkowane jest tylko najbliższe otoczenie chemiczne badanych atomów, zatem przy użyciu promieniowania X o dużej intensywności, metoda staje się bardzo czuła. Mając do dyspozycji wiązkę promieniowania X, można skanować próbkę, zmieniając energię wiązki padającej wokół krawędzi absorpcji i badać, do jakich stanów zostaje wzbudzony elektron. Oznacza to, że technika XAS pozwala na próbkowanie i otrzymanie informacji o gęstości nieobsadzonych stanów elektronowych atomu (ang. *Density of State*, DOS). Położenie widma na skali energii, jest bardzo czułe na formalny stopień utlenienia atomu. Ponadto, kształt widma silnie zależy od otoczenia chemicznego badanych atomów: rodzaju atomów sąsiadujących, odległości i wzajemnych kątów między wiązaniami chemicznymi.

W eksperymencie XAS, w którym wzbudzana jest krawędź K danego atomu, podczas pomiaru otrzymuje się widmo energetyczne powstające w wyniku zapelniania wakancji w stanie 1s przez elektron z podpowłoki 2p (jest to tzw. linia $K\alpha$) lub wyższej w funkcji energii wzbudzającej. Możliwe wzbudzenia oraz przejścia elektronowe z towarzyszącą emisją kwantów promieniowania fluorescencyjnego dla atomu z 4 grupy bloku d pokazane są na Rys. II. 1 C. Intensywność emisji jest wprost proporcjonalna do dostępnych stanów nieobsadzonych w atomie. W eksperymencie otrzymuje się więc zależność pomiędzy współczynnikiem osłabienia wiązki μ [cm^2/g], a energią E [eV] wiązki padającej – widmo absorpcyjne. W zależności od tego, jaka jest energia padających fotonów, można wyróżnić dwa podstawowe obszary w widmie rentgenowskim. Struktura przykrawędziowa (ang. *X-Ray Absorption Near Edge Structure*, XANES) jest to obszar do około 30 - 50 eV powyżej krawędzi absorpcji. Widmo XANES zawiera informacje na temat:

- 1) Stopnia utlenienia badanego typu atomów – poprzez położenie krawędzi absorpcji;
- 2) Symetrii w bezpośrednim otoczeniu chemicznym badanego atomu – poprzez strukturę przedkrawędziową;
- 3) Ligandów – poprzez wpływ orbitali p przyłączonych do atomu na widmo XANES oraz ogólny kształt krawędzi absorpcji;

W wielu widmach XANES metali bloku d, 4 grupy Układu Okresowego można zaobserwować małą strukturę zlokalizowaną przed krawędzią absorpcji, zwaną pikiem przedkrawędziowym lub prepikiem. Powstaje ona w wyniku przejść elektronowych z orbitalu 1s na orbital 3d, które normalnie jest wzbronione. Przejścia elektronowe odpowiadające za powstanie tej struktury są opisywane kwadrupolowymi regułami wyboru, dla których w szczególności $\Delta l = \pm 0, 2$. W widmie rentgenowskim są to normalnie przejścia wzbronione. W strukturach posiadających wysoką symetrię, zachodzi zjawisko *hybrydyzacji* (mieszania) orbitali typu d metalu przejściowego oraz orbitali typu p ligandów. Prowadzi to do obniżenia symetrii w rejonie atomu metalu, a także umożliwia przejścia elektronowe, które normalnie byłyby niedozwolone. Warto zaznaczyć, że tego typu zjawisko może zajść tylko jeśli orbital d jest niecałkowicie zapełniony. Dlatego właśnie widma XAS czystych metali nie posiadają piku przedkrawędziowego. Ponadto, pozwala to łatwo rozróżnić na przykład związki Cu(I) od Cu(II) gdyż występująca w związkach miedź Cu(I) posiada konfigurację elektronową $3d^{10}$.



Rysunek II. 2 Struktura widma XANES na przykładzie $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Zaznaczono piki: przedkrawędziowy, pochodzący od ligandu i powiązany z transferem ładunku oraz krawędź absorpcji, czyli, tzw. białą linię. Pomiaru widma dokonano na wiązce P64, na synchrotronie Petra III w Deutsches Elektronen-Synchrotron (DESY).

Pomiędzy pikami przedkrawędziowymi a głównym pikiem absorpcyjnym odpowiadającym za przejście $1s \rightarrow 4p$ (tzw. białą linią), w zależności od badanego związku w widmach XAS można zlokalizować dodatkowe piki sklasyfikowane jako przejścia $1s \rightarrow 4p + \text{LMCT}$ (Transfer Ładunku z Ligandu na Metal, ang. *Ligand to Metal Charge Transfer*, LMCT). Po wzbudzeniu i wytworzeniu wakancji rdzeniowej w atomie centralnym, następuje relaksacja stanów walencyjnych tego atomu, poniżej energii orbitali ligandów. Dzieje się tak dlatego, że mniej elektronów ekranuje

stany walencyjne i ich energia wiązania staje się większa. W wyniku wytworzenia wiązań chemicznych między atomem centralnym a ligandami, następuje transfer elektronów na bardziej korzystne energetycznie nieobsadzone w pełni stany walencyjne atomu centralnego. Położenie piku $1s \rightarrow 4p + LMCT$ na skali energii jest więc konsekwencją Zasady Zachowania Energii. Posługując się ponownie przykładem związków miedzi, piki $1s \rightarrow 4p + LMCT$ widać zarówno dla Cu_2O jak i dla CuO , przy czym dla $Cu(I)$ jest znacznie wyraźniejszy, gdyż różnica energetyczna jest większa.

Dokładny sposób wyprowadzenia zależności teoretycznej na przekrój czynny, opisujący strukturę przykrawędziową widm rentgenowskich zarówno na gruncie teorii semiklasycznej, jak i czysto kwantowej, można znaleźć w literaturze. W niniejszej pracy zostaną przedstawione tylko najważniejsze etapy wyprowadzenia kwantowego na gruncie mechaniki kwantowej. W kwantowym podejściu absorpcja promieniowania sprowadza się do wyznaczenia amplitudy przejścia ze stanu podstawowego do stanu wzbudzonego opisywanej przez hamiltonian oddziaływania:

$$H_{odz} = -\sum_i \frac{1}{m} \frac{e}{c} \mathbf{A}(\mathbf{r}_i, t) \mathbf{p}_i + \sum_i \frac{1}{2m} \left(\frac{e}{c} \mathbf{A}(\mathbf{r}_i, t) \right)^2 \quad (II.1)$$

gdzie: m – masa elektronu;

e – ładunek elementarny;

c – prędkość światła w próżni.

Wzór (II.1) zawiera dwa wektory: $\mathbf{A}(\mathbf{r}_i, t)$ – operator magnetycznego potencjału wektorowego pola promieniowania wzbudzającego i \mathbf{p}_i – wektor pędu elektronu. W przypadku absorpcji promieniowania, tylko pierwszy człon równania (II.1), zależny od $\mathbf{A}(\mathbf{r}_i, t) \mathbf{p}_i$ ma znaczenie. Na gruncie mechaniki kwantowej można również wyprowadzić dokładne wyrażenie na Złotą Regułę Fermiego, opisującą amplitudę przejścia w zależności od ogólnej postaci funkcji zaburzającej układ i zależnej od czasu:

$$w_{d\Omega} = \frac{2\pi}{\hbar} |\langle \psi_F | H_{odz} | \psi_I \rangle|^2 \delta(E_F - E_I - \hbar\omega) \quad (II.2)$$

gdzie: $\hbar \approx 6,582 \cdot 10^{-16} \text{ eV} \cdot \text{s} / \text{rad}$ – stała Diraca;

H_{odz} – hamiltonian oddziaływania pola wzbudzającego z elektronami;

E_F – energia stanu końcowego;

E_I – energia stanu początkowego;

$\hbar\omega = |E_F - E_I|$;

$\langle \psi_F |$ i $| \psi_I \rangle$ – funkcje opisujące stan końcowy i początkowy.

Delta Diraca pozwala na spełnienie Zasady Zachowania Energii. W obrazie Heisenberga (Oddziaływania), amplitudę przejścia ze stanu początkowego $|\Psi_I\rangle$ w czasie początkowym t_i do stanu końcowego $|\Psi_F\rangle$ w czasie końcowym t_f definiuje wyrażenie:

$$S_{FI} = \langle \psi_F | \overline{U(t_i, t_f)} | \psi_I \rangle \quad (\text{II.3})$$

gdzie: $U(t_i, t_f)$ – unitarny operator ewolucji czasowej;

H_0 – hamiltonian atomu w danym stanie stacjonarnym;

$$|\Psi_I'\rangle = e^{i\frac{H_0}{\hbar}t} |\Psi_I\rangle.$$

Wstawiając skwantowaną postać pola $\mathbf{A}(\mathbf{r}_i, t)$, zależną tylko od $e^{i\mathbf{k}\mathbf{r}}$ do wyrażenia (II.3) i dla wygody prowadząc obliczenia w Obrazie Oddziaływania, należy skorzystać z tzw. przybliżenia dipolowego. Jest to rozwinięcie członu $e^{i\mathbf{k}\mathbf{r}}$ do pierwszego członu, który uwzględnia przejścia dipolowe. W przypadku, gdy uwzględni się kolejny człon możliwy stanie się opis przejść elektrycznych kwadrupolowych. Na koniec, na mocy przybliżenia jednoelektronowego zakłada się, że elektron porusza się w uśrednionym potencjale od pozostałych elektronów, zatem sumowanie po stanach końcowych jest skończone, a przekrój czynny rozpatruje się dla jednego elektronu:

$$\sigma(\omega)_{abs} = 4\pi\alpha^2 \hbar\omega \sum_F |\widehat{\boldsymbol{\epsilon}}_{j,\mathbf{k}} \langle \psi_F | \mathbf{r} | \psi_I \rangle|^2 \delta(E_F - E_I - \hbar\omega) \quad (\text{II.3})$$

gdzie: $\alpha \approx 1/137$ – stała struktury subtelnej;

$\widehat{\boldsymbol{\epsilon}}_{j,\mathbf{k}}$ – czynnik uwzględniający polaryzację światła padającego.

Powyższe wzory w sposób formalny opisują absorpcję promieniowania rentgenowskiego i pozwalają teoretycznie opisać widma XANES.

B. Struktura subtelna powyżej krawędzi absorpcji – EXAFS [10]

W odległości 30 – 50 eV od krawędzi sygnał XANES przechodzi w strukturę subtelną ponad progiem absorpcji (ang. *Extended X-Ray Absorption Fine Structure*, EXAFS). Pomimo, że zarówno XANES jak i EXAFS są wywoływane tym samym zjawiskiem fizycznym, to reprezentują różne skale odpowiedzi układu wzbudzonego. Przejście z obszaru XANES do obszaru EXAFS ma płynny charakter i zależy od ilości dostępnych stanów struktury elektronowej atomu absorbującego. Granica pomiędzy sygnałami XANES i EXAFS jest pokazana na Rys. II. 3. W EXAFS-ie, fotoelektron przechodzi do Kontinuum, podczas gdy w rejonie XANES jest związany w stanie nieobsadzonym powyżej energii Fermiego. Ponadto, w przypadku EXAFSu, aparat matematyczny jest inny.

Widmo XAS jest to zależność masowego współczynnika absorpcji $\mu(E)$ w funkcji energii padającej. Powstaje, gdy elektron rdzeniowy zostaje wybity ze swojego położenia. Kiedy energia padającego promieniowania jest wystarczająco duża, wybity elektron uwalnia się z pola oddziaływania atomu i rozprasza na sąsiednich atomach (Rys. II. 3) – można to przedstawić, jako wydostanie się elektronu ze studni potencjału do Kontinuum. W wyniku interferencji fal elektronowych: powstającej na atomie wzbudzonym i rozproszonej na sąsiadującym atomie, pojawiają się oscylacje współczynnika absorpcji objawiające się jako sygnał EXAFS. Oznacza to, iż oscylacje nie będą zachodzić na atomach swobodnych. Ponadto, w strukturach periodycznych, jeżeli takie same atomy znajdują się w identycznych pozycjach, sygnał EXAFS ulega wielokrotnemu wzmocnieniu. Sygnał $\mu(E)$ można rozdzielić na składową tła $\mu_0(E)$ oraz sygnał EXAFS $\chi(E)$, który następnie można zdefiniować jako:

$$\mu(E) = \mu_0(E)(1 + \chi(E)) \quad (\text{II.4})$$

Powyższe wyrażenie można porównać do wyrażania opisującego absorpcję promieniowania X (II.3). Ze względu na fakt, iż absorpcja kwantu promieniowania X jest wymuszonym przejściem elektronu pomiędzy dwoma stanami kwantowymi, można go otrzymać z podejścia semiklasycznego, stosując ponownie tzw. Złotą Regułę Fermiego znaną ze wzoru (II.2):

$$\mu(E) \sim \delta(E_F - E_I - \hbar\omega) |\langle \psi_I | H_{odz} | \psi_F \rangle|^2 \quad (\text{II.5})$$

gdzie: $\mu(E)$ – współczynnik absorpcji, wprost proporcjonalny do przekroju czynnego na absorpcję promieniowania X;

$\langle \psi_I |$ – opisuje atom w stanie podstawowym oraz kwant promieniowania X;

$| \psi_F \rangle$ – opisuje atom z wakancją rdzeniową (dziurą rdzeniową) oraz fotoelektron.

Funkcja delta Diraca, jak wcześniej, zapewnia zachowanie energii. Na tym etapie pojawia się różnica w założeniach teoretycznych między widmami XANES i EXAFS. Ze względu na silne wiązanie elektronów rdzeniowych, nie są one wrażliwe na oddziaływanie otoczenia w tym sąsiednich atomów. Jednakże, w funkcji opisującej stan końcowy należy wyróżnić wkłady od atomu wzbudzonego i od rozproszonego na sąsiednich atomach fotoelektronu jako: $| \psi_F \rangle = | \psi_F \rangle_0 + | \Delta \psi_F \rangle$. Wstawiając sfaktoryzowany stan końcowy do równania II.5, a następnie rozpisując je, można otrzymać postać:

$$\mu(E) \sim |\langle \psi_I | H_{odz} | \psi_F \rangle_0|^2 \delta(E_F - E_I - \hbar\omega) \left[1 + \langle \psi_I | H_{odz} | \Delta \psi_F \rangle \frac{\langle \psi_F | H_{odz} | \psi_I \rangle^*}{|\langle \psi_I | H_{odz} | \psi_F \rangle_0|^2} + C.C \right] \quad (\text{II.6})$$

gdzie: * – sprzężenie zespolone;

$C.C$ – sprzężenie zespolone ostatniego wyrażenia w nawiasie.

Przyrównując wyrażenia (II.4) oraz (II.5) otrzymana się zależności:

$$\mu_0(E) \sim \left| \langle \psi_I | H_{odz} | \psi_F \rangle_0 \right|^2 \quad (\text{II.7a})$$

$$\chi(E) \sim \langle \psi_I | H_{odz} | \Delta \psi_F \rangle \quad (\text{II.7b})$$

Pierwszy wzór opisuje oddziaływanie pola z izolowanym atomem, natomiast drugi wzór wynika z rozpraszania fotoelektronu na sąsiednich atomach. Hamiltonian oddziaływania H_{odz} występujący we wzorach II. 2 – II. 4 b można opisać jak wcześniej wzorem II.1. Kolejne oddziaływania jedno- i dwufotonowe wyprowadza się rozwijając wyrażenie (II.1) względem kolejnych potęg $\mathbf{A}(\mathbf{r}_i, t)$. Oddziaływanie elektronu z fotonem jest opisywane przez rachunek zaburzeń I rzędu zależny od czasu, proporcjonalny do iloczynu wektorowego $\mathbf{A} \cdot \mathbf{p}_i$, natomiast pozostałe człony w takim przypadku się zaniedbuje. Aby uprościć pierwszy element wyrażenia (II.1), należy podstawić jawnie postać skwantowanego operatora $\mathbf{A}(\mathbf{r}_i, t)$ zależnego od wyrażenia e^{ikr} . Ścisłe związany stan 1s można przybliżyć funkcją delta Diraca. Wówczas zapisując równanie w postaci całkowej można otrzymać:

$$\chi(E) \sim \int dr \delta(r) e^{ikr} \Delta \psi_F \quad (\text{II.8})$$

Powyższą funkcję można rozumieć jako transformatę Fouriera jakiejś funkcji $\psi_{rozpr}(\mathbf{k}, r = 0)$. Oznacza to również, że sygnał EXAFS jest proporcjonalny do amplitudy fali rozproszonego fotoelektronu. Idąc dalej i zakładając $r \neq 0$ i wyliczając całkę (II.8) otrzyma się:

$$\psi_{rozpr}(\mathbf{k}, r) = \frac{e^{ikr}}{kr} \quad (\text{II.9})$$

Jest to fala kulista, która zaczyna się w miejscu powstania fotoelektronu. W przypadku najprostszego modelu rozproszenia, fotoelektron rozproszy się na atomie w odległości R , a rozproszona fala wróci do atomu początkowego, dla którego $r = 0$. Wówczas wymnażając w przestrzeni k przyczynki od poszczególnych etapów drogi optycznej fali otrzymujemy:

$$\chi(k) \sim \psi_{rozpr}(\mathbf{k}, 0) = \frac{e^{ikR}}{kR} [2kf(k)e^{i\delta(k)}] \frac{e^{ikR}}{kR} + C. C \quad (\text{II.10})$$

gdzie: $f(k)$ – funkcja określająca jakość rozpraszania (atomowa amplituda rozpraszania);

$\delta(k)$ – przesunięcie fazowe między falą padającą, a rozproszoną.

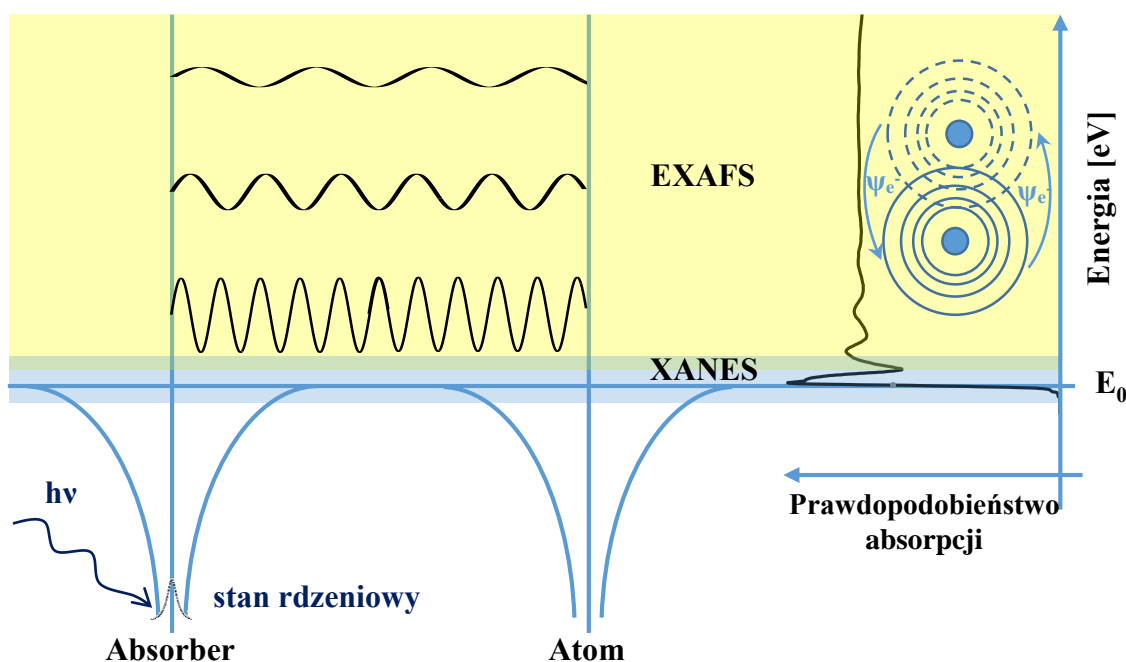
Dzięki temu EXAFS jest metodą czułą na rodzaj sąsiednich atomów. Równanie (II.10) można uprościć wykorzystując własności liczb zespolonych aby otrzymać:

$$\chi(k) = \frac{f(k)}{kR^2} \sin(2kR + \delta(k)) \quad (\text{II.11})$$

Warto zwrócić uwagę na fakt, że jest to funkcja rzeczywista. W następnym kroku należy uwzględnić fakt, iż opis teoretyczny powinien uwzględnić *wszystkie* rozproszenia między atomem centralnym, a sąsiednimi atomami w położeniach R_j . Oznacza to, iż należy uwzględnić liczbę koordynacyjną N wokół atomu absorbującego. Żadne rozproszenie, nawet w przypadku

identycznych par atomów, nie będzie takie samo, ze względu na efekty stochastyczne, na przykład drgania termiczne. Uwzględnia się to poprzez dodanie do wzoru (II.11) wyrażeń zawierających współczynniki Debye-Wallera σ . Ponadto, jeżeli atomy wokół absorbera są różne, należy wysumować wszystkie składowe rozpraszania pochodzące od każdego z typów atomów. Do tej pory w rozważaniach uwzględniane były tylko rozproszenia elastyczne, jednakże fotoelektrony mogą rozpraszać się także nieelastycznie na fononach i elektronach przewodnictwa. Ponadto zakładano, iż rozproszony fotoelektron wraca do atomu początkowego zanim ten atom zdąży deekscytować do stanu podstawowego (zapelniając dziurę rdzeniową), co nie zawsze jest prawdą. Aby uwzględnić ten efekt należy zmodyfikować funkcję (II.9), tak by otrzymać tłumioną kulistą funkcję falową. Czynnikiem tłumiący $\lambda(k)$, który pojawia się w takim wypadku uwzględnia zarówno rozproszenia nieelastyczne, jak i czas życia dziury rdzeniowej. Po uwzględnieniu wszystkich powyższych poprawek otrzyma się wyrażenie końcowe zwane równaniem EXAFS:

$$\chi(k) = \sum_j \frac{N_j f_j(k) e^{-2k^2 \sigma_j^2} e^{-2R_j/\lambda(k)}}{k R_j^2} \sin(2kR_j + \delta_j(k)) \quad (\text{II.12})$$



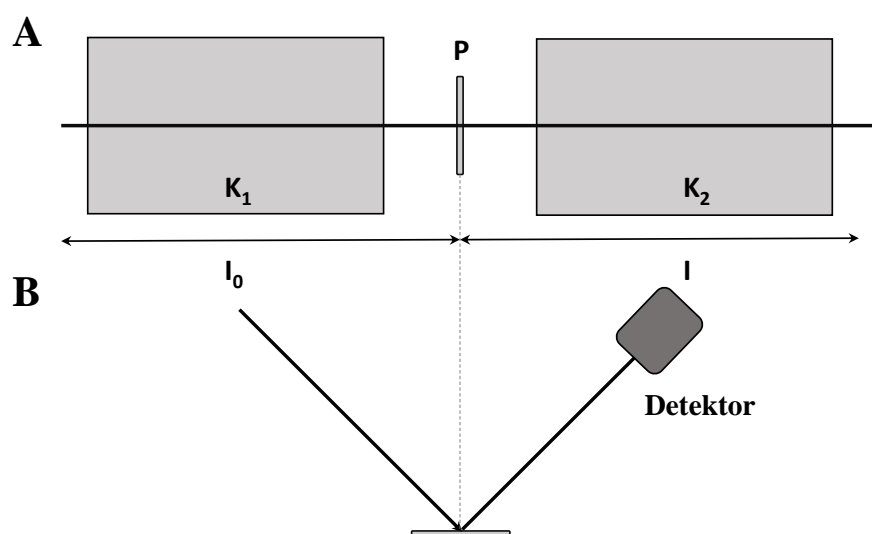
Rysunek II. 3 Absorpcja rentgenowska z podpowłoki $1s$. Elektrony $1s$ znajdują się na dnie studni potencjału. Fotoelektron wybity przez kwant promieniowania X może różnie zachować się w zależności od początkowej energii padającego promieniowania. Albo pozostanie w polu oddziaływania atomu (niebieskie tło), albo zostanie wybity do Kontinuum, gdzie będzie się rozpraszał na sąsiednich atomach i autointerferował (żółte tło). $h\nu$ –kwant promieniowania X , ψ_e - funkcja falowa interferującego elektronu. Rysunek na podstawie [10].

Równanie (II.12) pozwala na wyciągnięcie kilku wniosków na temat metody pomiarowej. Ze względu na obecność członu tłumiącego zależnego od $\lambda(k)$ oraz odwrotnej proporcjonalności $\chi(k)$ od R_j^2 , wkład do sygnału EXAFS pochodzący będzie głównie od pierwszej oraz częściowo od drugiej strefy koordynacyjnej wokół atomu. Dodatkowo, jak pokazano na Rys. II. 3, oscylacje EXAFS zależą od różnych częstotliwości, które odpowiadają różnym odległościom. Stąd analiza sygnału wymaga zastosowania Transformaty Fouriera. Wreszcie, aby przy pomocy Transformaty Fouriera poprawnie wyznaczyć odległości i liczby koordynacyjne, wymagana jest dobra znajomość pozostałych parametrów, w tym $f_j(k)$ oraz $\delta_j(k)$. Te dwa parametry można obecnie efektywnie wyznaczyć w niemal dowolnym układzie za pomocą metod obliczeniowych *ab-initio*. Niestety, metoda ta nie ma zastosowania do lekkich pierwiastków typu C, N, O, gdyż jak pokazuje wzór (II.12) oscylacje EXAFS lekkich pierwiastków są w praktyce nierozróżnialne.

Podsumowując, metoda pomiaru oscylacji EXAFS dostarcza informacji o liczbie koordynacyjnej, odległościach i rodzajach najbliższych sąsiadów wokół badanego atomu.

C. Metody pomiaru widm absorpcyjnych [10][11]

Jak już zostało opisane, podstawowym zadaniem monochromatora jest wybranie, przy pomocy warunku Bragga, promieniowania o ściśle określonej energii z wiązki wychodzącej z magnesu zakrzywiającego, wigglera, czy undulatora. Po przejściu przez system lusterek uformowana wiązka trafia do komory pomiarowej gdzie oddziałuje z próbką. Krytycznym



Rysunek II. 4. Schematyczne przedstawienie układów do pomiarów rentgenowskich absorpcyjnych: A – w modzie transmisyjnym; B – w modzie fluorescencyjnym. Na Rysunku zaznaczono również obszary wiązki pierwotnej I_0 i rejestrowanej I oraz komory jonizacyjne K_1 i K_2 .

elementem każdego układu eksperymentalnego jest układ pomiarowy, w tym detektor, pozwalające efektywnie wyznaczyć widmo promieniowania X, czyli zależność $\mu(E)$.

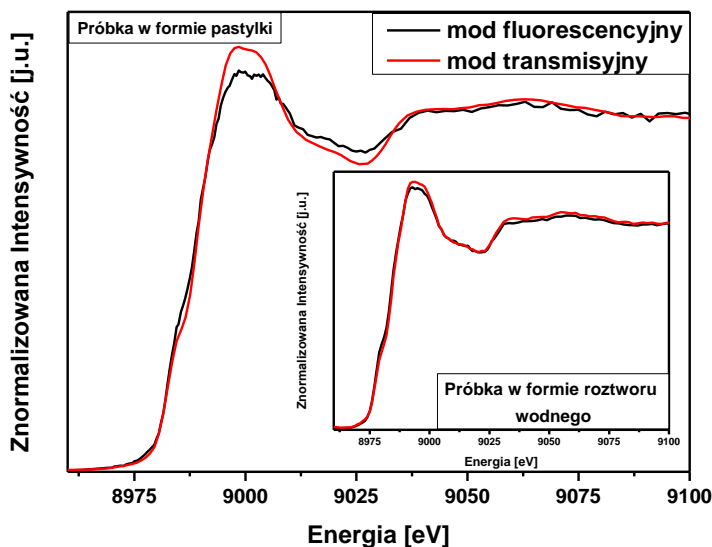
W spektroskopii rentgenowskiej istnieją trzy kanoniczne metody pomiaru współczynnika $\mu(E)$. Są to mody: transmisyjny, fluorescencyjny oraz elektronowy. Mody transmisyjny i fluorescencyjny są przedstawione schematycznie na Rys. II. 4. Najprostszy, odwołujący się do elementarnej definicji współczynnika absorpcji, jest mod transmisyjny pokazany na Rys. II. 4 A. W tej metodzie strumień wiązki promieniowania synchrotronowego mierzy się przy pomocy komór jonizacyjnych przed próbką (Φ_0) oraz po przejściu promieniowania przez próbkę (Φ). Następnie na podstawie przekształconego wzoru I.3 przelicza na stosunek intensywności:

$$\mu(E)d = \ln\left(\frac{I}{I_0}\right) - \ln C(E) \quad (\text{II.13})$$

gdzie $C(E)$ to gładka, wolno zmienna funkcja definiująca odpowiedź komór jonizacyjnych, którą rutynowo usuwa się z widma eksperymentalnego podczas procedury normalizacji widm, aby zminimalizować wkład od otoczenia i układu pomiarowego na widmo końcowe. Czułość pomiaru dokonywanego przy pomocy komór jonizacyjnych maleje wraz ze wzrostem energii promieniowania X. Dodatkowo, wynik pomiaru uwzględnia zmiany w profilu wiązki padającej powstające zarówno przed, jak i po jej przejściu przez próbkę, otoczenie próbki (np. powietrze), oraz okna wejściowe i wyjściowe obu komór. Łatwość interpretacji danych zebranych metodą transmisyjną wynika z faktu, że wszystkie czynniki zakłócające pomiar zawierają się w funkcji $C(E)$, którą odseparowuje się poprzez zlogarymowanie równania I.3. Metodę transmisyjną stosuje się do próbek cienkich, homogenicznych, o stałej grubości. Ponadto, stężenie absorbera w takiej próbce nie powinno być mniejsze niż 10%. Kryterium grubości próbki można zapisać jako $\mu(E)d \approx 2.6$ [12].

W przypadku gdy w eksperymencie do dyspozycji jest próbka niejednorodna, z bardzo małym (rzędu ppm) lub bardzo dużym stężeniem absorbera (więcej niż około 10 %), niehomogeniczna, wówczas można zastosować fluorescencyjny mod pomiarowy [13], przedstawiony na Rys. II. 4 B. Widma otrzymane w ten sposób nazywa się widmami całkowitej fluorescencji (ang. *Total Fluorescence Yield, TFY*). Jest to metoda znacznie bardziej skomplikowana, ze względu na stosowane detektory oraz kilka efektów fizycznych wymagających uwzględnienia. W modzie fluorescencyjnym, intensywność promieniowania charakterystycznego (fluorescencji) jest wprost proporcjonalna do ilości wybitych elektronów z danej powłoki elektronowej. W prosty sposób oznacza to, że:

$$\mu(E) \approx \frac{I_f}{I_0} \quad (\text{II.14})$$



Rysunek II. 5 Widma XANES ftalocyjanianu miedzi (II) zmierzone w modzie fluorescencyjnym (kolor czarny) oraz transmisyjnym (kolor czerwony) dla próbki w formie pastylki oraz roztworu wodnego (insert). Dla obu typów próbek stężenie absorbera nie przekraczało 5 % suchej masy. Pomiarów dokonano na wiązce XAFCA na synchrotronie Singapore Synchrotron Light Source w Singapurze dzięki uprzejmości dr Agnieszki Banaś.

modem transmisyjnym, a modem fluorescencyjnym nie przekroczyły 5 % i stało się tak dzięki temu, że stężenie Cu(II) w próbce było bardzo niskie. W trakcie oddziaływania z próbką, promieniowanie X może się rozpraszać zarówno elastycznie jak i nieelastycznie (efekt Comptona). Ponadto w widmie mogą pojawiać się piki pochodzące od innych pierwiastków oraz może być widoczny tzw. efekt samoabsorpcji, który dokładniej zostanie omówiony w następnym paragrafie. Wszystkie te efekty wpływają negatywnie na stosunek sygnału do szumu, co wyraźnie widać na Rys. II. 5. Geometria układu w pomiarze fluorescencyjnym jest inna niż w pomiarze transmisyjnym: zarówno wiązka padająca, jak i detektor rejestrujący promieniowanie charakterystyczne są ustawione pod kątem 45° do próbki i jednocześnie 90° względem siebie (Rys. II. 4 B). Jest to spowodowane faktem iż rozpraszanie elastyczne nie jest izotropowe, lecz zależy silnie od kąta bryłowego.

W przypadku rozpraszania elastycznego nie ma transferu energii, a wynik w postaci różniczkowego przekroju czynnego jest proporcjonalny do Transformaty Fouriera gęstości elektronowej. W rozpraszaniu nieelastycznym zachodzi transfer energii pomiędzy fotonem, a elektronami. Jednakże przy odpowiednio dużej energii padającej fali, można zaniedbać różnicę pomiędzy energią tej fali, a fali rozproszonej wynikającą z transferu energii. Ponadto

gdzie: I_f – intensywność fluorescencji rentgenowskiej;

I_0 – natężenie padającej na próbkę wiązki promieniowania.

Na Rys. II.5 pokazano różnicę między widmami rentgenowskimi tego samego związku, pochodnej ftalocyjanianu miedzi (II), zmierzonymi w modzie transmisyjnym i fluorescencyjnym.

Próbki mierzone były zarówno w postaci proszku jak i roztworu wodnego oraz obie formy miały stężenie około $50 \mu\text{M}$ jonów Cu(II), co w kontekście spektroskopii rentgenowskiej można uważać za niskie wartości. Różnice w otrzymanych widmach pomiędzy

dla wysokich energii, całkowity różniczkowy przekrój czynny w tym podejściu jest identyczny jak w podejściu semiklasycznym i równy przekrojowi Thompsona dla punktowego swobodnego elektronu o liczbie masowej Z :

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = Zr_e^2 \sin^2\theta \quad (\text{II.15})$$

Bardziej praktyczne podejście w przypadku projektowania eksperymentu z zastosowaniem Promieniowania Synchronotrowego ma wyprowadzony w 1926 roku na gruncie kwantowej elektrodynamiki wzór Kleina-Nishiny [14]:

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = \frac{\alpha^2 \hbar^2}{8m^2 c^2} \left(\frac{\lambda'}{\lambda}\right)^2 \left[\frac{\lambda}{\lambda'} + \frac{\lambda'}{\lambda} - \sin^2\theta\right] \quad (\text{II.16})$$

gdzie: $\alpha \approx 1/137$ – stała struktury subtelnej;

$\hbar \approx 6,582 \cdot 10^{-16} \text{ eV} \cdot \text{s}/\text{rad}$ – stała Diraka;

m – masa spoczynkowa elektronu;

c – prędkość światła w próżni;

λ oraz λ' – kolejno długości fal padającej i rozproszonej.

W przypadku nierelatywistycznym, gdy energia promieniowania padającego jest dużo większa od mc , wzór (II.16) redukuje się do klasycznego przekroju czynnego Thompsona. Dla wysokich energii, takich jak promieniowanie X, wzór (II.16) redukuje się do znanego wyrażenia na rozpraszanie Comptona. Widać więc, że w zakresie energetycznym promieniowania X i przy liniowej polaryzacji światła padającego, wkład elastyczny do rozpraszania jest zaniedbywalny. Najważniejszym wnioskiem płynącym z wzoru (II.16) jest fakt, iż umieszczając detektor pod kątem 90° względem wiązki padającej, otrzymuje się minimalne rozpraszanie albowiem, jak pokazuje wzór (II.15), przekrój czynny na rozpraszanie osiąga minimum.

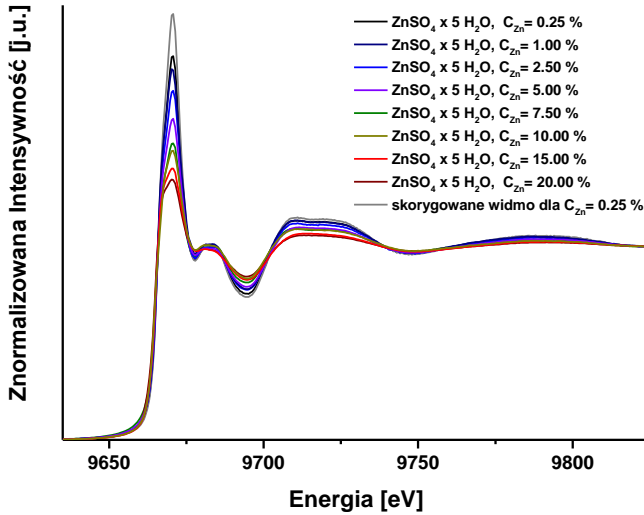
Kolejnym czynnikiem, ważnym w trakcie pomiarów fluorescencyjnych, jest wyeliminowanie wkładu do widm od innych pierwiastków. W tym celu na drodze optycznej promieniowania charakterystycznego umieszcza się odpowiednie filtry. Są to najczęściej cienkie folie zbudowane z pierwiastka o liczbie atomowej $Z - 1$ względem badanego w eksperymencie pierwiastka. Dodatkowo, do rejestracji fluorescencji rentgenowskiej można użyć wysokorozdzielczych detektorów półprzewodnikowych: krzemowych lub germanowych. Pozwalają one na wybór niewielkiego zakresu energetycznego spośród całego spektrum i wykonanie pomiaru z wysoką zdolnością rozdzielczą. Dodatkowo, ze względu na duży kąt bryłowy, z którego detektory zbierają kwanty promieniowania fluorescencyjnego, są one czułe i można je stosować do próbek o stężeniach rzędu ppm. Wadami takiego rozwiązania są: nieco wyższy stosunek sygnału do szumu niż w pomiarach transmisyjnych, tzw. czas martwy

detektora, większy stopień skomplikowania budowy i utrzymania działania układu pomiarowego względem detektorów scyntylacyjnych oraz liczników opartych o zjawisko jonizacji gazu. Czas martwy detektora jest to minimalny czas, jaki musi upłynąć, aby detektor mógł zarejestrować kolejne zdarzenie. W przypadku, gdy informacja dociera w krótszym czasie niż elektronika może ją przetworzyć, detektor ulega zjawisku saturacji. Detektory półprzewodnikowe ze względu na swoją skomplikowaną budowę wymagają większej ilości dodatkowej elektroniki do przetwarzania sygnału. Dodatkowo, wyższy stosunek sygnału do szumu można obniżyć, chłodząc detektory przy użyciu ciekłego azotu.

Trzecią metodą pomiaru współczynnika $\mu(E)$ jest pomiar elektronów wtórnych oraz całkowitego prądu z próbki. Zjawisko zachodzi, gdy elektron relaksujący ze stanu wzbudzonego, może przekazać część swojej energii na inne elektrony. Jeżeli taki przekaz nastąpi w rejonie bliskim powierzchni próbki, wówczas elektrony te mogą one zostać wyemitowane. Ta technika wymaga jednak specyficznych próbek, które w szczególności muszą dobrze przewodzić prąd elektryczny. Ze względu na fakt, iż w niniejszej pracy badane były głównie próbki biochemiczne lub modele układów biologicznych, technika pomiaru widm XAS oparta na rejestrowaniu elektronów wtórnych nie była stosowana w trakcie zbierania danych zawartych w niniejszej Pracy i nie będzie dalej omawiana.

D. *Efekt samoabsorpcji* [15]

Najczęściej spotykanym rodzajem badanych próbek są próbki zbyt grube lub niewystarczająco homogeniczne, aby móc wykonać pomiar transmisyjny. W takim przypadku wykonuje się pomiar w modzie fluorescencyjnym. W trakcie eksperymentu wiązka padająca wzbudza fluorescencję rentgenowską w całej objętości, w której oddziałuje z próbką. Kwanty promieniowania charakterystycznego również muszą pokonać określoną objętość próbki, aby zostać zarejestrowane w detektorze. Wówczas może dojść do dwóch zjawisk zmieniających zarejestrowaną końcową liczbę kwantów fluorescencji promieniowania charakterystycznego. Po pierwsze, wyemitowana w trakcie oddziaływania z wiązką pierwotną fluorescencja może zostać zaabsorbowana ponownie przez próbkę. Jednakże ten efekt nie zależy od energii promieniowania wzbudzającego i nie zmienia kształtu oraz względnej wysokości pików w widmie absorpcyjnym [16]. Drugim efektem jest tzw. efekt samoabsorpcji [17,18], który ma nieliniowy wpływ na poszczególne fragmenty widma rentgenowskiego, co prowadzi do zniekształcenia sygnału. Fizycznie, wynika on z faktu, iż promieniowanie X wnika w próbkę na różną głębokość w zależności od energii. Jak wiadomo, najbardziej absorbowane jest promieniowanie o energii odpowiadającej krawędzi absorpcji, zatem w tym zakresie



Rysunek II. 6 Widma XANES $ZnSO_4 \times 5H_2O$ zmierzone w modzie fluorescencyjnym dla próbki o grubości 1 mm, w formie pastylki zawierającej różne stężenia związku w zakresie od 0.25 % do 20 %. Wyniki porównano do sygnału skorygowanego ze względu na efekt samoabsorpcji w programie Athena, przy użyciu algorytmu FLUO. Pomiarów dokonano na wiązce P64 na synchrotronie Petra III w Deutsches Elektronen-Synchrotron (DESY).

energetycznym promieniowanie wnika najpłycej w próbkę. Co za tym idzie, zmniejsza się objętość próbki, jaka ulega wzbudzeniu i tym samym mniej promieniowania charakterystycznego zostaje wyemitowane. Natomiast, promieniowanie o energii spoza obszaru krawędzi absorpcji wnika głębiej w próbkę, gdyż jest słabiej absorbowane. W sumie, silna absorpcja promieniowania X w pobliżu krawędzi absorpcji powoduje lokalne deformacje widm absorpcyjnych. Jak pokazano na Rys. II. 6 na przykładzie $ZnSO_4 \times 5H_2O$, zniekształcenia widm są szczególnie widoczne dla dużych stężeń absorberów.

W praktyce opis sygnału fluorescencyjnego oparty na wzorze (II.14) jest znacznym uproszczeniem.

Przed wszystkim nie uwzględnia on wspomnianego wyżej czynnika jakim jest oddziaływanie wiązki z próbką na całej drodze promieniowania oraz faktu, iż intensywność wiązki promieniowania padającego maleje, gdy kwant zostaje zaabsorbowany lub rozproszony przez elektron. Równocześnie, intensywność promieniowania charakterystycznego rośnie. Aby uwzględnić te efekty, za [18] można przyjąć model oddziaływania opisany na Rys. II. 7 oraz w obliczeniach poniżej. Rysunek Rys. II. 7 przedstawia dokładny schemat pomiaru fluorescencyjnego współczynnika $\mu(E)$, który uwzględnia wymienione wyżej efekty oraz fakt, iż fluorescencja rentgenowska może być rejestrowana tylko w określonym kącie bryłowym $\frac{\Omega}{4\pi}$. Zakładając, że promieniowanie rentgenowskie o intensywności I_0 pada na próbkę pod kątem θ_0 , wówczas może wnikać do próbki na głębokość Z . Sygnał fluorescencyjny I_f z fragmentu próbki o grubości dz można opisać jako:

$$I_f(E)dz = \left(\frac{\Omega}{4\pi}\right) I_0 e^{-\mu_t(E)\frac{Z}{\sin\theta_0}} \varepsilon_f(E)\mu_e(E) \frac{dz}{\sin\theta_0} e^{-\mu_e(E_f)\frac{Z}{\sin\theta_f}} \quad (II.17)$$

gdzie: $\mu_t(E)$ – całkowity współczynnik absorpcji, uwzględniający zarówno wkład od współczynnika absorpcji dla danej krawędzi absorpcji $\mu_e(E)$ oraz wkład od pozostałych atomów;

E – energia wiązki padającej;

E_f – energia fluorescencji rentgenowskiej;

$\mu_e(E)$ – współczynnik absorpcji promieniowania o energii E ;

$\mu_e(E_f)$ – współczynnik absorpcji promieniowania charakterystycznego;

$\varepsilon_f(E)$ – prawdopodobieństwo zaniku wakancji rdzeniowej poprzez proces radiacyjny (fluorescencję rentgenowską);

θ_f – kąt detekcji promieniowania charakterystycznego.

Zjawisko fluorescencji rentgenowskiej może zachodzić tylko wtedy, gdy energia wiązki padającej jest w pobliżu lub powyżej krawędzi absorpcji, podobnie zjawisko samoabsorpcji. Wyrażenie (II.17) ma zastosowanie tylko do znormalizowanych widm absorpcyjnych. Trzy wyróżnione elementy w równaniu (II.17) kolorami niebieskim, żółtym i zielonym opisują kolejno: intensywność promieniowania padającego o energii E na głębokości Z , efektywną drogę optyczną fotonu na nieskończonym odcinku próbki o grubości dz przy założeniu jej lokalnej jednorodności oraz liczbę fotonów o energii E_f , które powstały na głębokości Z . Aby otrzymać całkowity sygnał fluorescencyjny jaki wydostaje się z próbki w kącie bryłowym $\frac{\Omega}{4\pi}$ należy równanie (II.17) scałkować po całkowitej grubości próbki. Wówczas:

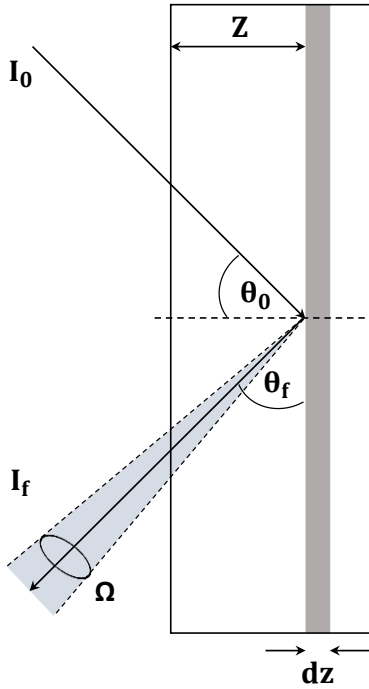
$$I_f(E) = \frac{\Omega}{4\pi} I_0 \frac{\varepsilon_f(E)\mu_e(E)}{\mu_t(E)+\mu_e(E_f)\frac{\sin\theta_0}{\sin\theta_f}} \left[1 - e^{-\left(\mu_t(E)+\mu_e(E_f)\frac{\sin\theta_0}{\sin\theta_f}\right)\frac{Z}{\sin\theta_0}} \right] \quad (\text{II.18})$$

W dużej części przypadków badane próbki są nieprzenikliwe dla monochromatycznej wiązki o energii zbliżonej do krawędzi absorpcji. Innymi słowy, taka próbka może być rozpatrywana jako „nieskończenie” gruba, wobec czego $\mu_t(E)Z \gg 1$. Pozwala to zaniedbać czynnik eksponencjalny w wyrażeniu (II.18). Otrzymuje się wtedy:

$$\frac{I_f(E)}{I_0} = \frac{\Omega}{4\pi} \varepsilon_f(E) \frac{\mu_e(E)}{\mu_t(E)+\mu_e(E_f)\frac{\sin\theta_0}{\sin\theta_f}} \quad (\text{II.19})$$

Ponadto, w typowym eksperymencie absorpcyjnym w geometrii fluorescencyjnej, oba kąty: θ_0 oraz θ_f wynoszą 45° tak, jak na Rysunkach II. 4 A i II. 7. Jeżeli dodatkowo stężenie absorbera jest wystarczająco duże, można założyć, że wkład do $\mu_t(E)$ od tła jest pomijalny i $\mu_t(E) \approx \mu_e(E)$. Wraz z rosnącą energią, dla pewnej energii powyżej krawędzi absorpcji, w rejonie EXAFS dochodzi do sytuacji gdy $\mu_e(E) \gg \mu_e(E_f)$ co prowadzi do niemal stałego

wyrażenia na $\frac{I_f(E)}{I_0}$ we wzorze (II.19). W efekcie, gwałtowne zmiany udziału $\mu_e(E_f)$ w zależności od energii prowadzą do niejednorodnego zmniejszenia intensywności pików widm XANES oraz tłumienia oscylacji EXAFS, co w efekcie może prowadzić do znaczących niepewności przy wyznaczaniu liczb koordynacyjnych.



Rysunek II. 7 Schemat eksperymentu przeprowadzanego w geometrii fluorescencyjnej z uwzględnieniem efektu samoabsorpcji.

W praktyce efekt samoabsorpcji występuje zawsze, gdy ma się do czynienia z widmami XAS zmierzonymi w modzie fluorescencyjnym. Jednakże można zmniejszyć skalę tego zjawiska, poprzez odpowiednią preparatykę próbki oraz dobranie warunków eksperymentu. Przy odpowiednio cienkiej próbce, spełniającej założenie $\mu_t(E)Z \ll 1$, w standardowej geometrii fluorescencyjnej, równanie (II.19) można zapisać jako:

$$\frac{I_f(E)}{I_0} = \frac{\Omega}{4\pi} \varepsilon_f(E) \mu_e(E) Z \quad (\text{II.20})$$

gdzie eksponenta we wzorze (II.18) została rozwinięta w szereg Taylora. Z kolei rozcieńczając próbkę, zwiększa się udział tła w współczynniku absorpcji $\mu_t(E)$, który staje się dominujący w równaniu (II.19). Równocześnie, można dokonywać detekcji fluorescencji rentgenowskiej pod bardzo małymi kątami, co prowadzi do zmniejszenia kąta θ_f , czyli również wartości $\sin\theta_f$. W efekcie, czynnik

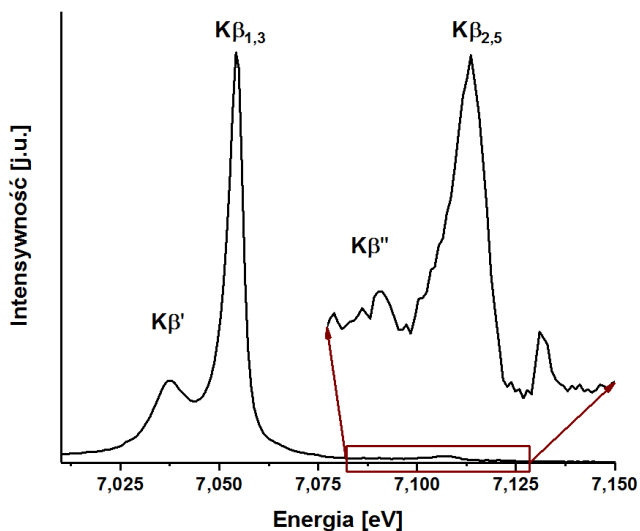
$\mu_e(E_f) \frac{\sin\theta_0}{\sin\theta_f}$ w równaniu (II.19) silnie wzrasta. Ze względu

na konieczność zachowania bardzo małych kątów w takim eksperymencie wymagana jest idealnie gładka powierzchnia próbki. Ponadto przy małym kącie detekcji w widmie fluorescencyjnym detektor widzi bardzo mały kąt bryłowy, co przekłada się na zdecydowanie niższą czułość takiego pomiaru [18].

II. 2 Spektroskopia Emisyjna Promieniowania Rentgenowskiego

A. Spektroskopia Emisyjna Promieniowania X [19]

Wiązka promieniowania X, w szczególności monochromatyczna, padając na próbkę może zostać zaabsorbowana, jeżeli jej energia odpowiada energiom wiązania elektronów na poszczególnych orbitalach. Zjawisko to zostało opisane w paragrafie *Spektroskopia*



Rysunek II. 8 Nierezonansowe widmo XES dla α - Fe_2O_3 . Pokazano obszar energetyczny obejmujący piki $K\beta_{1,3}$ oraz obszar walencyjny (piki $K\beta_{2,5}$). Ponadto widoczne są piki satelitarne $K\beta'$ i $K\beta''$. Widmo otrzymano na wiązce SuperXAS (10XDA) w Swiss Light Source, Paul Scherrer Institut w Szwajcarii za pomocą dyspersyjnego spektrometru w geometrii von Hamosa.

jest to więc metoda uzupełniająca do metody XAS w kontekście informacji o stanie elektronowym układu. Widmo emisyjne zawiera struktury, które można przyporządkować do przejść pokazanych na Rys. II. 1 C. Wszystkie przejścia elektronowe zachodzą jednocześnie, a różnica w intensywności pików w trakcie eksperymentu wynika z różnego prawdopodobieństwa zajścia przejścia (nakładających się funkcji falowych). W związku z tym do pomiaru widma używa się spektrometrów dyspersyjnych pozwalających oddzielić wkład od każdej linii emisyjnej ze względu na jej energię. Przykładowe widmo emisyjne Fe dla hematytu, reprezentującego metale typu 3d, pokazano na Rys. II. 8. Pominięto tam jedynie linie emisyjne $K\alpha_1$ oraz $K\alpha_2$, gdyż są to przejścia dipolowe ze stanów $2p_{3/2}$ i $2p_{1/2}$ na stany $1s$ o bardzo dużej intensywności. Umożliwiają one dokonanie uproszczonego opisu stanów początkowych i końcowych. Linia $K\alpha_1$ zawiera informację o spinach w badanym układzie, jest czuła na zmiany całkowitego spinu [20,21], zawiera dominujący wkład od sprzężenia spin-orbita dla stanu $2p$. Stosunek intensywności $K\alpha_1/K\alpha_2$ równy około 2 odpowiada stosunkowi stanów wysokospinowych do niskospinowych [21] (4 elektrony $2p_{3/2}$ i 2 elektrony $2p_{1/2}$). Każdy z pików widma $K\beta$ XES na Rys. II. 8 zawiera inne informacje na temat stanu elektronowego badanego układu [22–24]. Widmo $K\beta$ XES pozwala między innymi na zidentyfikowanie

absorpcyjna promieniowania rentgenowskiego. W trakcie eksperymentu XAS, w zależności od energii wiązki padającej badana jest liczba przejść elektronowych na stany nieobsadzone atomu lub do Kontinuum. Jeżeli jednak przy stałej energii padającego promieniowania zbada się pewien zakres energetyczny emitowanej intensywności fluorescencji rentgenowskiej, to otrzyma się zupełnie inną informację o układzie. Tego typu widmo, zmierzone z odpowiednią rozdzielczością energetyczną nazywane jest widmem emisyjnym promieniowania X. Zawiera ono informację o elektronowych stanach obsadzonych badanego układu.

Spektroskopia Emisyjna Promieniowania X

rodzaju, hybrydyzacji oraz protonacji ligandów [24,25]. Linie główne $K\beta'$ oraz $K\beta_{1,3}$ są charakteryzowane przez przejścia dipolowe ze stanów 3p na stany 1s i są wrażliwe na obecność niesparowanych elektronów na orbitalach 3d metali oraz na stopień utlenienia atomu metalu typu 3d [24,26]. Pik $K\beta'$ zawiera wkłady od jednolicie spolaryzowanej frakcji spinów elektronowych na stanach walencyjnych metalu i pozwala rozróżnić między sobą poszczególne stany spinowe badanej struktury elektronowej [21]. Ponadto, pik $K\beta'$ jest czuły na oddziaływania, które wpływają na zmianę całkowitego spinu metalu [24], a także na transfer ładunku [26]. Rozszczepienie między pikami $K\beta_1$, a $K\beta_3$ jest dla przykładu żelaza na Rys. II. 8 niewidoczne, gdyż oba przejścia mają energię 7089,3 eV. Aby móc rozróżnić te linie, różnica w położeniu energetycznym obu przejść musiałaby być większa niż ich energetyczna szerokość stanu (ok. 1,4 eV). Jest to możliwe dopiero dla atomów cięższych od Zn. Rozszczepienie pomiędzy pikami $K\beta_{1,3}$ oraz $K\beta'$ wynika głównie ze skali oddziaływania wymiennego między stanami 3p i 3d w stanie końcowym [21,27], a z kolei to oddziaływanie wynika z obecności niezerowego spinu na stanach 3d. Ponadto, linia $K\beta_{1,3}$ zawiera wkład od rozszczepienia spin-orbita stanu 3p [25,28]. Jednocześnie te przejścia są mniej wrażliwe na inne efekty związane z otoczeniem chemicznym atomu niż linie $K\beta_{2,5}$ i $K\beta''$ znajdujące się w części walencyjnej widma XES. Region wysokoenergetyczny widma emisyjnego to przejścia walencyjne (ang. *Valence-to-core, v2c*), które znajdują się tuż poniżej energii Fermiego. Dla metali typu 3d, piki $K\beta_{2,5}$ są rządzone dipolowymi regułami wyboru, odpowiadają przejściom z orbitali walencyjnych ligandów typu p na stany 1s metalu [24,28]. Dzięki mieszanemu się orbitali 3d badanego metalu i orbitali typu p ligandów, możliwe stają się zabronione przejścia 3d \rightarrow 1s (7130 eV na Rys. II. 8) [24]. Z kolei satelitarnemu pikowi $K\beta''$ przypisane jest przejście z orbitalu 2s ligandu na orbital 1 s metalu [24]. Jest ono możliwe tylko wtedy, gdy podobnie jak w przypadku piku przedkrawędziowego, następuje mieszanie się stanów typu d metalu ze stanami typu s ligandu, umożliwiając przejście elektronowe. Niska intensywność linii satelitarnych $K\beta_{2,5}$ i $K\beta''$ wynika z bardzo małego nakładania się funkcji falowych stanów 1s i walencyjnych. Ponadto, silnie zależy od długości wiązań chemicznych między metalem a ligandami. Analiza pochodzenia linii emisyjnych, w szczególności $K\beta'$ i $K\beta''$, wymaga zastosowania obliczeń *ab-initio* metodami Teorii Funkcjonału Gęstości (ang. *Density Functional Theorem, DFT*) lub formalizmu całkowitego wielokrotnego rozpraszania (ang. *Full Multiple Scattering, FMS*). Ponadto, w obecności linii satelitarnych w widmie $K\beta$ XES kryje się ogromna przewaga metody XES nad EXAFS: pozwala ona w jednoznaczny sposób rozróżnić nawet lekkie ligandy wokół metalu na podstawie obecności piku $K\beta''$ [27].

Podstawowym ograniczeniem metody XES jest konieczność zastosowania spektrometrów dyspersyjnych z kryształem analizującym. Nawet wówczas, gdy pomiar jest dokonywany przy pomocy perfekcyjnych kryształów analizujących, to wynik jest ograniczony przez efekty geometryczne spektrometru oraz przez czasy życia wakancji rdzeniowych. Dodatkowo, intensywność sygnału, szczególnie w rejonie pików $K\beta_{1,3}$ i $K\beta_{2,5}$, jest bardzo niska w porównaniu do sygnału otrzymywanego na liniach $K\alpha_{1,2}$. Wymaga to dłuższych pomiarów oraz warunków eksperymentalnych możliwie jak najbardziej zmniejszających uszkodzenia radiacyjne. Zastosowanie wiązek Promieniowania Synchrotronowego o wysokiej intensywności, pozwala rozwiązać większość problemów związanych z małą intensywnością przejść w wysokoenergetycznym rejonie widm emisyjnych oraz pozwala znacznie poprawić rozdzielczość pomiaru poprzez wykonywanie pomiarów rezonansowych.

B. Spektroskopia Rezonansowej Emisji Rentgenowskiej [19,29,30]

Poprzednio, na gruncie mechaniki kwantowej opisane zostały pierwszorzędowe efekty oddziaływania promieniowania elektromagnetycznego z elektronami w atomach. W dalszej części rozdziału przybliżony zostanie wzór Kramersa–Heisenberga (KH). Pozwala on w jednorodny sposób opisać teoretycznie oddziaływania takie jak rozpraszanie Comptona, Rayleigha, nieelastyczne i rezonansową emisję promieniowania X (ang. *Resonant X-ray Emission Spectroscopy, RXES*).

Wykorzystując Hamiltonian oddziaływania (II.1) można wykonać rachunek perturbacyjny zależny od czasu [31]. Zaburzenie wywołuje przejścia między stanami własnymi układu. W przypadku metody RXES i równania KH, oddziaływanie następuje pomiędzy polem elektromagnetycznym i elektronem, a zaburzeniem jest cały hamiltonian oddziaływania (II.1). Zarówno w stanie początkowym, jak i końcowym obecne są elektron i foton jednakże w trakcie oddziaływania następuje przekaz energii, pędu oraz zmiana kierunku fali elektromagnetycznej. Ponadto, wzbudzenie zachodzi poprzez stany pośrednie $|n\rangle$. Prawdopodobieństwo wystąpienia stanu pośredniego $|n\rangle$ opisanego funkcją falową $|\psi_n\rangle$, maleje z czasem jak $e^{-\frac{\Gamma_n t}{2\hbar}}$, gdzie Γ_n oznacza szerokość tego stanu, zależną od jego czasu życia². Po wykonaniu rachunku zaburzeń II rzędu zależnego od czasu z uwzględnieniem stanów $|n\rangle$, wykorzystując Złotą Regułę Fermiego, można wyznaczyć różniczkowy przekrój czynny. Wówczas otrzyma się równanie KH, wyrażające różniczkowy przekrój czynny na oddziaływanie fotonów z elektronami:

² $\Gamma_n \cong \frac{\hbar}{\tau_n}$, gdzie τ_n oznacza czas życia stanu $|n\rangle$.

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = r_0^2 \frac{\omega'}{\omega} \left| (\boldsymbol{\varepsilon} \cdot \boldsymbol{\varepsilon}') \delta_{F,I} - \frac{1}{m} \sum_{i,n} \frac{\langle \psi_F | \mathbf{p}_i \hat{\boldsymbol{\varepsilon}} | \psi_n \rangle \langle \psi_n | \mathbf{p}_i \hat{\boldsymbol{\varepsilon}} | \psi_I \rangle}{E_n - E_I - \hbar\omega - \frac{\Gamma_n}{2}} + \frac{\langle \psi_F | \mathbf{p}_i \hat{\boldsymbol{\varepsilon}} | \psi_n \rangle \langle \psi_n | \mathbf{p}_i \hat{\boldsymbol{\varepsilon}} | \psi_I \rangle}{E_n - E_I + \hbar\omega'} \right|^2 \quad (\text{II.21})$$

gdzie: $r_0 = \frac{e^2}{4\pi m c^2}$;

ω – częstość kołowa promieniowania padającego;

ω' – częstość kołowa promieniowania rozproszonego;

$\boldsymbol{\varepsilon}$ – wersor kierunkowy polaryzacji fali promieniowania padającego;

$\boldsymbol{\varepsilon}'$ – wersor kierunkowy polaryzacji fali promieniowania rozproszonego;

$\delta_{F,I}$ – delta Kroneckera zapisana dla stanów początkowych (I) i końcowych (F);

m – masa spoczynkowa elektronu;

$|\psi_n\rangle$ – funkcja falowa stanu początkowego;

$\langle \psi_F |$ – funkcja falowa stanu końcowego;

$|\psi_n\rangle$ – funkcja falowa stanu pośredniego;

E_I – energia stanu początkowego;

E_n – energia stanu końcowego.

Równanie (II.21) przedstawia pełny wzór Kramersa-Heisenberga [32]. Powyższe wyrażenie jest podstawą do analizy teoretycznej wielu eksperymentów. Opisuje on teoretycznie doświadczenia typu Wysokorozdzielczej Pozarezonansowej Spektroskopii Rentgenowskiej (ang. *High Resolution Off-Resonant Spectroscopy*, HEROS) [33] oraz Rezonansowego Elastycznego Rozpraszania Promieniowania X [34], które jednak nie jest przedmiotem niniejszej rozprawy.

Spektroskopia Rezonansowego Nieelastycznego Rozpraszania Promieniowania X (ang. *Resonant Inelastic X-Ray Scattering*, RIXS) [19],[35],[36] lub inaczej Spektroskopia Rezonansowej Emisji Rentgenowskiej [19],[29],[30], jest to metoda zachowująca bilans fotonów, zwana w języku angielskim *photon-in photon-out spectroscopy*. Oznacza to, że tą metodę z punktu widzenia teoretycznego można traktować jak rozpraszanie oraz jak konwolucję absorpcji oraz emisji promieniowania X. Słowo „rezonansowa” oznacza w praktyce, że wzbudzenie elektronów rdzeniowych następuje na stany związane powyżej energii Fermiego, w pobliżu krawędzi absorpcji. Klasyczny nierezonansowy XES (nXES) jest to z kolei wzbudzenie elektronów rdzeniowych do Kontinuum. W takim przypadku widmo emisyjne nie zależy w żaden sposób od energii wzbudzenia. Dodatkowo w przypadku RXES proces deekscytacji wakancji rdzeniowej następuje natychmiast, co różni tę metodę od „klasycznej” nXES. Wydawałoby się, że jako efekt optyczny II rzędu, a wartości bezwzględne przekrojów czynnych dla RXES są znacznie niższe niż dla XAS czy XES. Zależą

one bowiem od czynnika r_0^2 , natomiast XAS i nXES są proporcjonalne do α^2 [11]. Tymczasem, we wzorze (II.21) w nawiasie znajdują się kolejno trzy człony: rozpraszanie Thomsona, człony rezonansowy i nierezonansowy. Rozpraszanie Thomsona można wyeliminować dobierając odpowiednio geometrię układu: dla kąta 90° pomiędzy wiązką padającą i detektorem, czynnik $\varepsilon \cdot \varepsilon'$ zaniknie. Zakładając energię wiązki padającej w pobliżu krawędzi absorpcji, można pominąć człony nierezonansowe, gdyż ich amplituda jest rzędu r_0 , podczas gdy amplituda członu rezonansowego jest rzędu długości fali $\lambda(\omega)$ (10^{-10} Å) [32]. Wówczas, przy założeniu wzajemnej ortogonalności stanów początkowego, końcowego oraz przejściowych można otrzymać wyrażenie opisujące przekrój czynny opisujący rezonansowe rozpraszanie promieniowania X w sposób analityczny [33,37]:

$$\frac{d\sigma(\omega)}{d\omega'} = 2\pi r_0^2 \int \frac{\omega'}{\omega} \frac{(\omega_{1s} - \omega_{np}) g_{np \rightarrow 1s}(\omega_{1s} + \omega'') \frac{dg_{1s}}{d\omega''}}{(\omega_{1s} + \omega'' - \omega)^2 - \left(\frac{\Gamma_{1s}}{2\hbar}\right)^2} \cdot \frac{\Gamma_{np}/2\hbar}{(\omega - \omega_{np} - \omega'' - \omega')^2 + \left(\frac{\Gamma_{np}}{2\hbar}\right)^2} d\omega'' \quad (\text{II.22})$$

gdzie: $\hbar \omega_{1s}$ i $\hbar \omega_{np}$ – energie stanu podstawowego i końcowego;

$\hbar \omega$ i $\hbar \omega'$ – energie wiązki padającej i rozproszonej;

$g_{1s \rightarrow np}$ – funkcja opisująca prawdopodobieństwo przejść (siłę oscylatora) między stanami końcowymi a początkowymi (zapełnienie wakancji rdzeniowej);

$\frac{dg_{1s}}{d\omega''}$ – funkcja opisująca prawdopodobieństwo wzbudzenia atomu w procesie absorpcji;

Γ_{1s} – czas życia dziury rdzeniowej.

Indeks np oznacza n -ty orbital typu p , przy czym $n = 2, 3$ lub 4 . Skończony czas życia stanów końcowych Γ_{np} jest uwzględniony w drugim członie pod całką w równaniu (II.22) jako profil funkcji Lorentza. W idealnym przypadku, profil Lorentza we wzorze (II.22) można zastąpić funkcją delta Diraca [37], która gwarantuje zachowanie energii:

$$\frac{d\sigma(\omega)}{d\omega'} = 2\pi r_0^2 \int \frac{\omega'}{\omega} \frac{(\omega_{1s} - \omega_{np}) g_{np \rightarrow 1s}(\omega_{1s} + \omega'') \frac{dg_{1s}}{d\omega''}}{(\omega_{1s} + \omega'' - \omega)^2 - \left(\frac{\Gamma_{1s}}{2\hbar}\right)^2} \cdot \delta(\omega - \omega_{np} - \omega'' - \omega') d\omega'' \quad (\text{II.23})$$

Jej obecność wynika m. in. z przejścia z opisu kwantowego (II.21) do (II.22-23) i opisuje stany końcowe. Jak widać z powyższego wzoru, czasy życia stanu podstawowego i wzbudzonego są ze sobą ściśle powiązane. Stan przejściowy w RXES, oznaczony we wzorze (II.21) jako $|\psi_n\rangle$, jest jednocześnie stanem końcowym dla XAS, co oznacza, że wynik eksperymentu zawiera zarówno informację o stanach obsadzonych jak i nieobsadzonych badanego atomu.

Ponieważ przekrój czynny zależy od energii padającej oraz od energii emisji, układy pomiarowe konstruuje się tak, aby móc jednocześnie zbierać sygnały XAS i XES. W takim doświadczeniu skanuje się próbkę monochromatyczną wiązką Promieniowania Synchronotronowego o zmiennej energii, prowadząc akwizycję fluorescencji rentgenowskiej

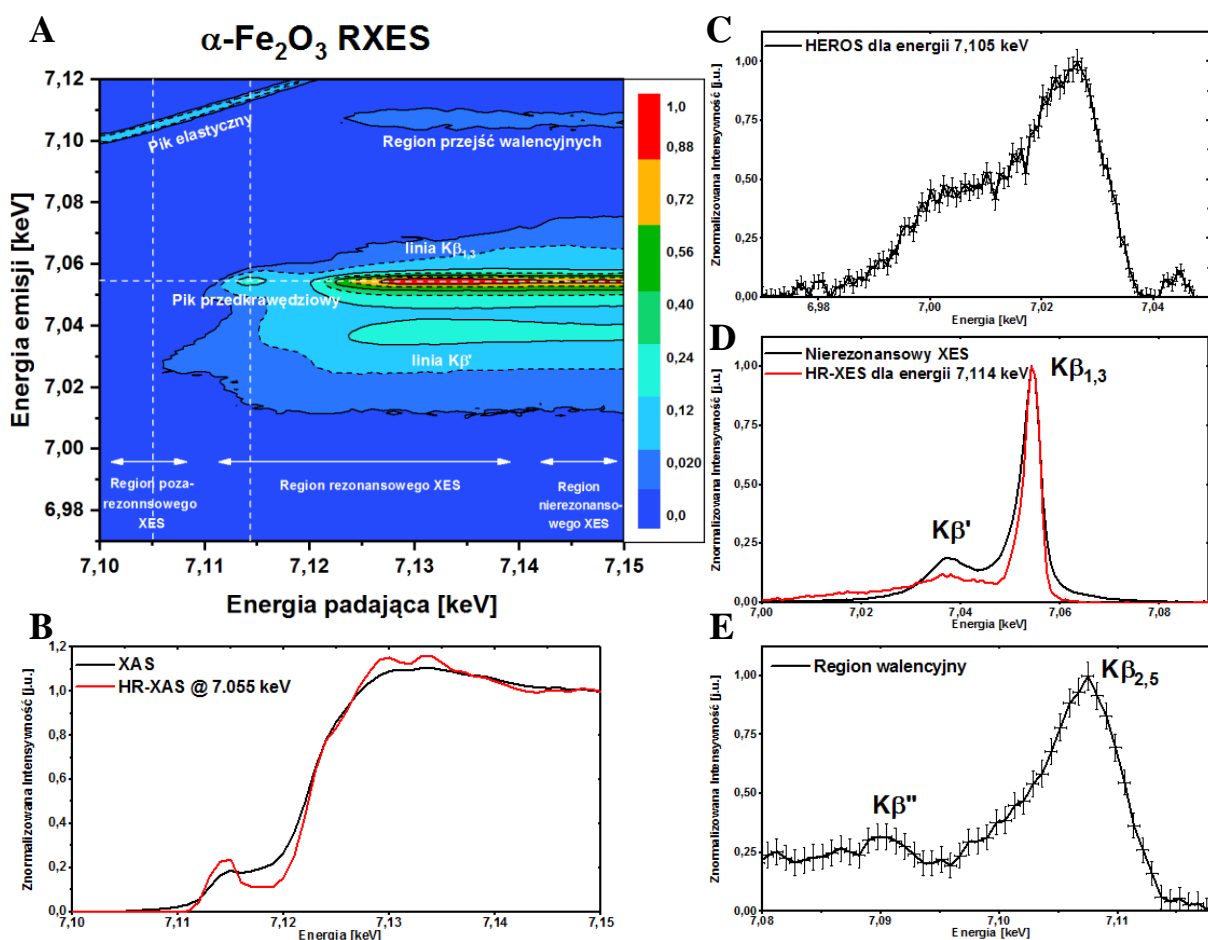
za pomocą dyspersyjnego układu pomiarowego. Wówczas wynik otrzymywany jest w postaci dwuwymiarowej mapy RXES zmierzonej przy krawędzi absorpcji, na przykład tak, jak pokazano na Rys. II. 9 A dla pomiaru w obszarze krawędzi K żelaza w $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$. W części emisyjnej obszar pomiaru obejmował piki $K\beta_{1,3}$ oraz $K\beta_{2,5}$, natomiast w części absorpcyjnej obszar XANES widma absorpcyjnego. Na mapie zaznaczono również wszystkie charakterystyczne obszary: wspomniane piki $K\beta_{1,3}$ oraz $K\beta_{2,5}$, pik przedkrawędziowy, region walencyjny, pik elastyczny, oraz wyszczególniono obszary mapy, w których widmo XES ma cechy pozarezonansowego (HEROS), rezonansowego i nierezonansowego. Pik elastyczny powstaje, gdy rozpraszanie zachodzi bez transferu energii, zatem wykorzystuje się go w kalibracji energetycznej map. Aby otrzymać widmo XAS należy scałkować intensywności fluorescencji z wybranego zakresu widm emisyjnych wzdłuż energii padającej. Z kolei, aby wyznaczyć widmo XES należy scałkować intensywności fluorescencji dla wybranego zakresu energii padających wzdłuż energii emisji.

Całkowite poszerzenie widm Γ_c wynika ze skończonego czasu życia stanów początkowego Γ_{1s} i końcowego Γ_{np} oraz poszerzenia aparaturowego i szerokości wiązki padającej. Poszerzenie Γ_N , na które składają się wartości Γ_{1s} i Γ_{np} można zgodnie z Zasadą Nieoznaczoności Heisenberga wyznaczyć jako:

$$\frac{\hbar}{\Gamma_N} = \frac{\hbar}{\Gamma_{1s}} + \frac{\hbar}{\Gamma_{np}} \quad (\text{II.24})$$

Oznacza to, że pomiar energii przejścia między stanami 1s i np będzie obarczony niepewnością o wartości $\Delta E = \frac{\hbar}{\Gamma_N}$. Dla szerokości $\Delta E = 1 \text{ eV}$, wartość Γ_N odpowiada niepewności 0,66 fs. Rozkład energetyczny fotonów w danym przejściu ma charakter funkcji Lorentza o szerokości równej ΔE , a wartość Γ_N nazywa się szerokością naturalną stanu. W praktyce należy jeszcze uwzględnić poszerzenie aparaturowe pochodzące od użytego spektrometru i szerokości wiązki padającej, które razem ma charakter funkcji Gaussa i często dominuje w eksperymencie. Pomiar przejścia rentgenowskiego może zostać wykonany z rozdzielczością energetyczną mniejszą niż szerokość naturalna stanu, a zatem z bardzo małym poszerzeniem instrumentalnym. Wówczas będzie można wykonać całkowanie obszaru mapy RXES w wybranym, wąskim zakresie energii emisji. Spowoduje to częściowe wyeliminowanie poszerzenia wynikającego z czasu życia dziury rdzeniowej Γ_{1s} . Rys. II. 9 B prezentuje widmo XAS zestawione z wysokorozdzielczym (ang. *High Resolution*, HR) widmem XAS dla energii emisji 7,055 keV (maksimum intensywności dla linii emisyjnej $K\beta_{1,3}$). Takiej analizy można dokonać dla różnych energii emisji.

Skanując próbkę energią padającą można otrzymać mapę RXES, na której można wyróżnić trzy obszary. W znacznej odległości od krawędzi absorpcji, dominuje Wysokorozdzielcza Spektroskopia Pozarezonansowa Promieniowania X (HEROS) [33]. Przykład widma HEROS pokazany jest na Rys. II. 9 C. Ze względu na fakt, iż energia padająca nie jest wystarczająco bliska do energii krawędzi absorpcji, brakująca wartość energii wymagana do promocji elektronu w procesie koherentnym jest uzupełniana kosztem energii kwantów promieniowania emitowanego. W wyniku zachowania energii, otrzymuje się rentgenowskie emisyjne widma pozarezonansowe, które opisują stany nieobsadzone układu. Metoda jest wysokorozdzielcza, gdyż ze względu na jednoczesność wzbudzenia i deekscytacji, udział w poszerzeniu widma ma tylko skończony czas życia stanu końcowego. Jak wszystkie



Rysunek II. 9 A – Mapa RXES próbki $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ wraz z zaznaczonymi najważniejszymi przejściami oraz obszarami poza-, nie-, i rezonansowymi; B – porównanie widma HR-XAS dla energii emisji 7055 eV z widmem TFXAS; C – widmo HEROS otrzymane dla energii padającej 7105 eV; D – porównanie widm XES z HR-XES dla energii wiązki padającej równej 7114 eV; E – region walencyjny widma emisyjnego. Mapę otrzymano na wiązce SuperXAS (10XDA) w Swiss Light Source, Paul Scherrer Institut w Szwajcarii za pomocą dyspersyjnego spektrometru w geometrii von Hamosa. Niepewności na rysunkach C i E zostały wyznaczone jako \sqrt{N} , gdzie N to ilość zliczeń. Rysunek zaadaptowano z [34].

widma rentgenowskie emisyjne i to nie podlega efektowi samoabsorpcji. Można to wykorzystać i dokonać transformacji widma HEROS na niezmodulowane widmo XAS przy użyciu transformacji Kramersa-Heisenberga [33].

Na Rys. II. 9 D oraz E pokazane są fragmenty widma emisyjnego w zakresie struktur $K\beta_{1,3}$ oraz $K\beta_{2,5}$ dla hematytu, analogicznie do Rys. II. 8, Rys. II. 9 D przedstawia linię $K\beta_{1,3}$ dla jednej energii padającej 7,114 keV (oznaczoną jako HR-XES) oraz w całym obszarze energii padającej. Obie linie zostały znormalizowane do maksimum w celu porównania. Widać wyraźnie różnice między nimi, w szczególności mniejszą szerokość głównej linii $K\beta_{1,3}$ oraz mniejszą intensywność linii satelitarnej dla sygnału HR-XES. W przypadku widma walencyjnego, ze względu na bardzo małą intensywność sygnału, na Rys. II. 9 D pokazane zostało widmo walencyjne z widoczną linią satelitarną $K\beta''$.

Jak widać z Rys. II. 9, dzięki selektywnej ze względu na badany pierwiastek metodzie RXES, możliwe jest otrzymanie pełnej informacji o strukturze elektronowej badanego pierwiastka. Część emisyjna mapy opisuje stany obsadzone, podczas gdy część absorpcyjna opisuje związane stany nieobsadzone powyżej energii Fermiego. Ponadto możliwe jest zidentyfikowanie ligandów badanego atomu oraz ominięcie problemu samoabsorpcji w widmach XAS. Aby jednak móc wykorzystać możliwości spektroskopii RXES potrzebny jest odpowiedni układ eksperymentalny oraz metody obliczeniowe pomagające zanalizować otrzymane dane.

C. Układy pomiarowe

Ze względu na rozszerzoną informację w porównaniu do XAS, układy pomiarowe służące do detekcji promieniowania charakterystycznego w metodzie XES mają nieco bardziej skomplikowaną budowę. W przypadku spektroskopii XAS, badana była intensywność promieniowania X danej, pojedynczej linii emisyjnej, najczęściej $K\alpha_1$, w funkcji energii wiązki padającej. W przypadku metody XES rejestrowane jest widmo emisyjne, czyli zależność intensywności wszystkich linii emisyjnych w funkcji energii emisji promieniowania charakterystycznego. Dodatkowo, wszystkie przejścia w badanej próbce zachodzą jednocześnie, więc aby rozdzielić linie względem siebie, należy prowadzić pomiar w modzie dyspersyjnym ze względu na energię.

Detektory półprzewodnikowe zbudowane z krzemu lub germanu rejestrują sygnał w dyspersyjnym modzie energetycznym, skonstruowane są na zasadzie diody półprzewodnikowej spolaryzowanej w kierunku zaporowym tak, aby usunąć wszystkie wolne nośniki ładunku [35]. Detekcja sygnału zachodzi, gdy kwant promieniowania X wpada

do warstwy zaporowej i wytwarza pary elektron-dziura w ilości proporcjonalnej do swojej energii. Taki detektor, by zachować akceptowalną zdolność rozdzielczą musi być stale chłodzony ciekłym azotem podczas pomiaru. Zaletą detektorów półprzewodnikowych jest szerokie spektrum energetyczne pracy oraz wysoka zdolność rozdzielcza.

Rejestracja sygnału za pomocą detektora półprzewodnikowego w modzie dyspersji długości fali jest efektywniejsza i zapewnia około 100-krotnie lepszą energetyczną zdolność rozdzielczą. W tej metodzie wykorzystuje się kryształ analizujący (analizator) wykorzystujący warunek Bragga do przestrzennego rozdzielania promieniowania charakterystycznego emitowanego z próbki. Następnie takie promieniowanie kierowane jest na detektor promieniowania X. Warunek Bragga można opisać znaną zależnością

$$n\lambda = 2d_{hkl}\sin\theta \quad (\text{II.25})$$

gdzie: n – kolejny rząd dyfrakcji ($n = 1, 2, 3 \dots$);

λ – długość fali;

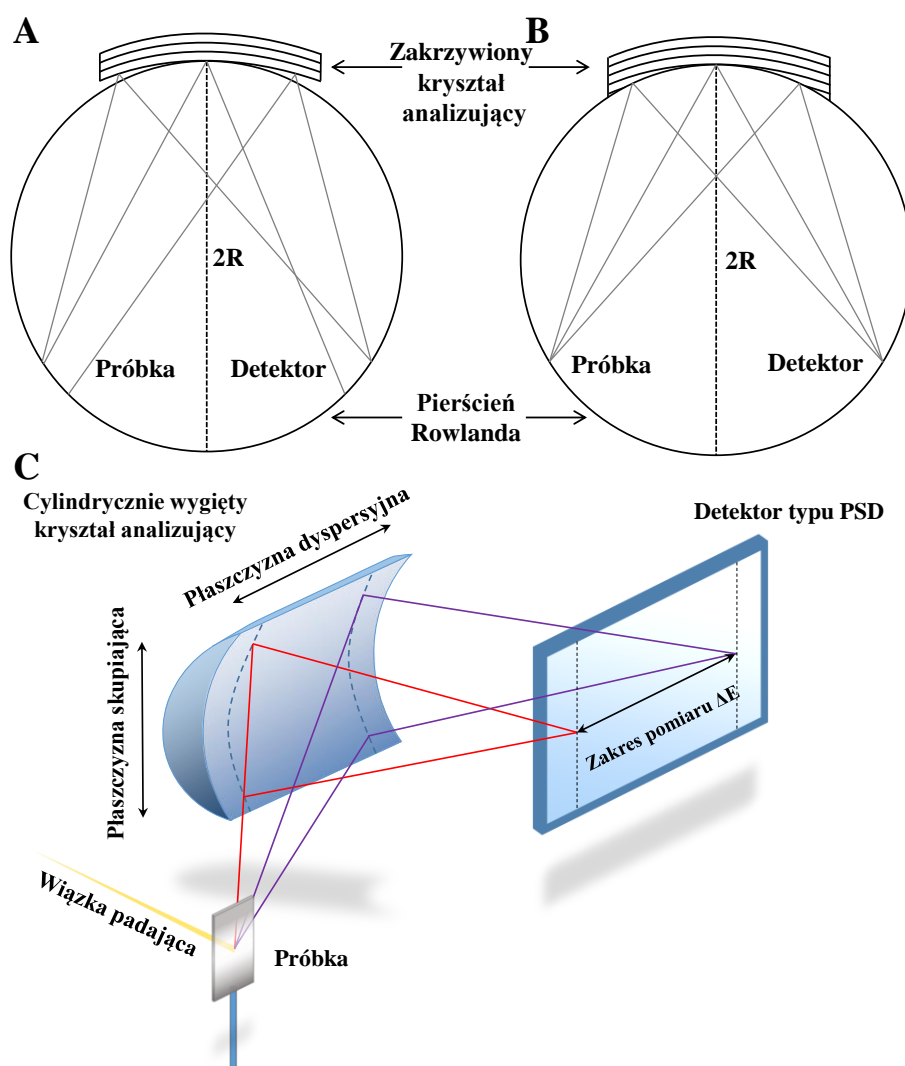
d_{hkl} – odległość między kolejnymi płaszczyznami sieciowymi zdefiniowanymi współczynnikami Millera hkl ;

θ – kąt między płaszczyzną a wiązka padającą lub odbitą.

Istnieją różne typy kryształów analizujących w zależności od sposobu wycięcia kryształu i ułożenia płaszczyzn sieciowych względem padającego na nie promieniowania, jednakże w niniejszej pracy opisany zostanie sposób pozwalający skonstruować odbiciowy lub Braggowski spektrometr promieniowania X. Ponadto, kryształ może być pojedynczy lub zbudowany z kilku fragmentów oraz płaski lub wygięty.

W zastosowaniu do nierezonansowej spektroskopii XES, można użyć siatki płaskich kryształów analizujących. Mają one bardzo mały kątowny zakres dyfrakcyjny, jednakże zastosowanie macierzy takich kryształów kompensuje straty związane z niezbyt wydajną dyfrakcją [38–40]. Płaska powierzchnia dyfrakcyjna zapewnia również najlepszą możliwą zdolność rozdzielczą układu. W celu polepszenia wydajności stosuje się zagięte kryształy analizujące. Układy pomiarowe występują w dwóch wariantach zagięcia kryształu: w płaszczyźnie dyspersyjnej lub w formie kryształów sferycznych [41]. Pierwotnym rozwiązaniem, pokazanym na Rys. II. 10. A było umieszczenie kryształu analizującego, próbki i detektora na jednym okręgu, tzw. okręgu Rowlanda i poprzez zmienianie kąta Bragga systematyczne rejestrowanie widma emisyjnego. Jest to tak zwana geometria Johanna [42]. Kryształ analizujący jest zgięty w płaszczyźnie pierścienia Rowlanda. W takim przypadku detektor służy jako licznik fotonów, a cały pomiar jednego widma może trwać wiele godzin. Geometria oparta na pierścieniu Rowlanda ma zaletę dużej intensywności sygnału

wyjściowego, co jednakże wiąże się z nieco obniżoną rozdzielczością energetyczną pomiaru [41]. Na Rys. II. 10. A promień zagięcia kryształu analizującego nie pasuje do promienia okręgu Rowlanda, co powoduje straty rozdzielczości w geometrii Johanna [41,43]. Jej modyfikacją jest geometria Johanssona [44], w której oba promienie są zgodne (Rys. II. 10. B). Alternatywnym rozwiązaniem jest geometria von Hamosa z kryształem analizującym wygiętym cylindrycznie, prostopadle do płaszczyzny dyspersyjnej (Rys. II. 10. C). W takim układzie zachowywana jest wysoka energetyczna zdolność rozdzielcza przy jednocześnie znacznie wyższej intensywności sygnału niż w przypadku płaskich kryształów dyfrakcyjnych. W geometrii von Hamosa stosuje się także dwuwymiarowe detektory z dyskryminacją pozycji (ang. *Position Sensitive Device*, *PSD*), co umożliwia wykonanie pomiaru widma emisyjnego w czasie zbliżonym do czasu



Rysunek II. 10. Geometrie pomiarów w układzie RXES. A – geometria Johanna, w której niedopasowanie promieni wycięcia kryształu i okręgu Rowlanda powoduje utratę zdolności rozdzielczej; B – geometria Johanssona, w której promienie wycięcia kryształu i okręgu Rowlanda do siebie idealnie pasują; C – geometria von Hamosa do pomiarów w energetycznym modzie dyspersyjnym.

akwizycji jednego punktu pomiarowego dla wcześniej opisanych rozwiązań. Pomiar wykonuje się poprzez rejestrację widm emisyjnych dla kolejnych energii wiązki padającej. Ze względu na dyspersyjny charakter detekcji emisji rentgenowskiej, skanując monochromatyczną wiązką promieniowania synchrotronowego badaną próbkę i rejestrując sygnał fluorescencyjny można otrzymać dwuwymiarową mapę RXES. Obecnie, układy pomiarowe w geometrii von Hamosa są często stosowanym rozwiązaniem w połączeniu z Promieniowaniem Synchrotronowym lub źródłami FEL służącymi do przeprowadzania eksperymentów typu RXES [33,34,45–50].

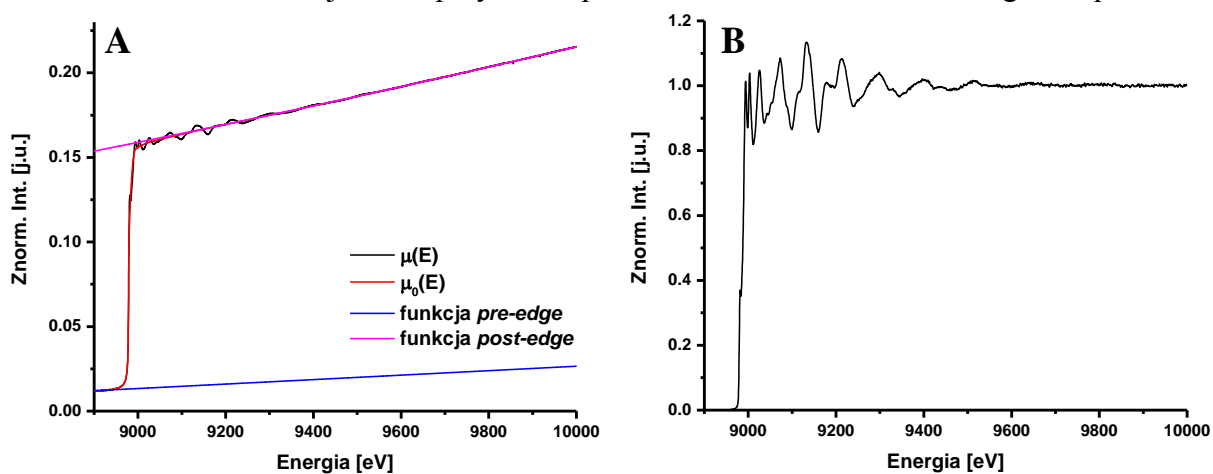
III. Metody obliczeniowe

W poprzednich rozdziałach przybliżone zostały podstawy teoretyczne na jakich bazują użyte w niniejszej Pracy metody eksperymentalne. W następnym rozdziale opisane zostaną wykorzystane metody analizy danych eksperymentalnych: normalizacji, usuwania tła, obliczeń *ab-initio*. Część technik bazuje na przytoczonych podstawach teoretycznych. Omówiona zostanie analiza i obliczanie widm teoretycznych XANES oraz EXAFS, korekta samoabsorpcji, a także obliczanie widm RXES.

III. 1 Podstawowe metody analizy widm rentgenowskich

A. Wstępna analiza widm XAS

W trakcie eksperymentu XAS rejestrowana jest intensywność sygnału w zależności od energii wiązki padającej. Zarówno w przypadku modu transmisyjnego jak i fluorescencyjnego, sygnał zawiera wkład od tła oraz jest nieznormalizowany. W ogólności uniemożliwia to jakiegokolwiek wiarygodne porównywanie wyników eksperymentalnych, bowiem widmo XAS wrażliwe jest zarówno na stan próbki jak i na bardzo wiele czynników aparaturowych. Procedura normalizacji widm pozwala na usunięcie wspomnianych niedogodności widm XAS. Istnieje wiele programów służących do wstępnej analizy widm rentgenowskich, jako przykład można przytoczyć takie pakiety jak WinXAS [51], EDA [52] oraz Athena [53]. Ponadto opublikowano wiele programów dedykowanych do teoretycznego obliczania widm XAS jak na przykład oparte o formalizm wielokrotnego rozpraszania



Rysunek III. 1 Redukcja danych w eksperymencie XAS przy pomocy programu Athena. A – surowe widmo XAS folii miedzianej wraz z funkcją tła oraz obszarami przedkrawędziowym, zakrawędziowym; B – widmo absorpcyjne Cu po normalizacji i korekcie samoabsorpcji.

programy GNXAS [54] i FEFF [55] oraz o Teorię Funkcjonału Gęstości (ang. *Density Functional Theory, DFT*), jak na przykład FDMNES [56]. Wszystkie procedury normalizacji w niniejszej Rozprawie zostały wykonane przy użyciu programu Athena, natomiast obliczenia teoretyczne widm XAS przeprowadzono w programie FEFF. W programie Athena analiza jest wykonywana przy pomocy algorytmu AUTOBK [57], który pozwala usunąć tło oraz znormalizować wyniki tak, aby były niezależne od warunków przeprowadzania eksperymentu, na przykład intensywności wiązki promieniowania, izotropowości próbki, czy filtrów obecnych na drodze optycznej wiązki promieniowania. Do poprawnego znormalizowania surowego widma, takiego jak na Rys. III. 1 A potrzebne są trzy elementy: parametr E_0 oraz poprawnie zdefiniowane rejony przedkrawędziowy (ang. *pre-edge*) i zakrawędziowy (ang. *post-edge*) składające się na zakres normalizacji. W programie, z II pochodnej widma należy wybrać odpowiednią wartość E_0 , zdefiniowaną jako pierwsze miejsce zerowe funkcji w rejonie krawędzi absorpcji. Następnie dla zakresów przedkrawędziowego i zakrawędziowego należy dobrać po dwa punkty ograniczające obszary normalizacji, w których dopasowywane są kolejno funkcje liniowa i wielomian trzeciego stopnia, co jest pokazane na Rys. III. 1 A. Na podstawie wybranych parametrów algorytm wylicza stałą normalizacji $\mu_0(E_0)$, przez którą dzieli dane. W efekcie, w wyniku normalizacji, przed krawędzią absorpcji sygnał powinien wynosić 0, a za krawędzią zmierzać do wartości 1 (Rys. III. 1 B). Tak przygotowany wynik eksperymentu może zostać porównany z innymi wynikami lub poddany dalszej analizie jak na przykład korekta samoabsorpcji, dopasowywanie kombinacji liniowej widm referencyjnych lub dopasowywanie pików widocznych na widmie eksperymentalnym XAS.

B. Procedura kombinacji liniowej widm referencyjnych

W wielu eksperymentach, widmo doświadczalne XAS jest składową kilku widm absorpcyjnych dla tego samego pierwiastka, ale w różnym otoczeniu chemicznym. Może się tak stać np. w trakcie wieloetapowej reakcji redoks lub w cyklu katalitycznym. W takim eksperymencie można ilościowo zbadać wkład poszczególnych składników do widma heterogenicznego, jeżeli dysponuje się odpowiednimi widmami referencyjnymi. Przed analizą należy znormalizować wszystkie widma. Analizy metodą kombinacji liniowej można dokonać w programie Athena. W jej trakcie program dokonuje dopasowania kombinacji liniowej widm referencyjnych do widma badanego, a każda z referencji ma odpowiednią wagę. Wagi są normalizowane do wartości 1, co umożliwia prostą ilościową interpretację wyników. Dopasowanie jest oceniane statystycznie pod względem różnicy między modelem, a widmem badanym poprzez parametr R [58]:

$$R = \sum \frac{(\mu_{exp} - \mu_{fit})^2}{(\mu_{exp})^2} \quad (\text{III.1})$$

gdzie: μ_{exp} – wartość eksperymentalna masowego współczynnika absorpcji;

μ_{fit} – wypadkowa wartość masowego współczynnika absorpcji w kombinacji liniowej.

W niniejszej rozprawie, parametr R posłużył jako bezwzględny współczynnik oceny jakości dopasowania. Wartości R poniżej 0,05 przyjmowano za dobre dopasowanie. Oprócz parametru R , kolejne dopasowania można porównać między sobą stosując znany statystyczny współczynnik χ^2 . Zmiana χ^2 na mniejszą wartość oznacza względną poprawę jakości dopasowania. Spośród wszystkich wykonanych dopasowań w danej analizie zawsze wybierano wynik o możliwie najmniejszych wartościach parametrów R oraz χ^2 , przy jednoczesnej zgodności z wiedzą na temat badanego układu pochodzącą z innych metod badawczych.

III. 2 Obliczanie widm *ab-initio* metodą wielokrotnego rozpraszania funkcji elektronowej [59–61]

Obliczenia teoretyczne w niniejszej pracy doktorskiej wykonane zostały w dużej części przy pomocy pakietu FEFF 9.6. Jest to program do obliczeń *ab-initio* widm między innymi XAS i XES oraz odpowiadającym im funkcji gęstości stanów. Teoria wykorzystana w kodzie źródłowym programu opiera się o tak zwane wielokrotne rozpraszanie elektronów reprezentowanych przez jednociłowe funkcje Greena. W tej interpretacji należy rozumieć funkcję Greena jako propagator amplitudy funkcji falowej elektronu z pozycji r do r' .

A. Hamiltonian oddziaływania i potencjał miseczkowy

Zaletą programu FEFF jest użycie efektywnych przybliżeń pozwalających ominąć niezwykle czasochłonny proces sumowania stanów początkowych i końcowych układu w oparciu o funkcje falowe. W teorii wielokrotnego rozpraszania, na której opiera się program FEFF, zjawisko absorpcji fotoelektronu można opisać za pomocą jednociłowej Złotej Reguły Fermiego z odpowiednim hamiltonianem, zdefiniowanym przez równanie Dysona :

$$\left[-\frac{1}{2} \nabla^2 + V_c(E) + V_{df}(E) + \Sigma(E) \right] \Psi = E\Psi \quad (\text{III.2})$$

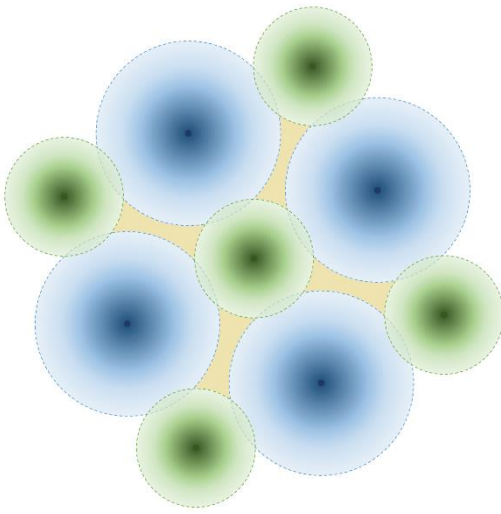
gdzie: $V_c(E)$ – uśredniony potencjał Coulombowski odczuwany przez fotoelektron;

$\Sigma(E)$ – energia własna (ang. *self-energy*) zdefiniowana jako analog potencjału korelacyjno-wymiennego w obliczeniach stacjonarnych. Jednocześnie jest

ekwiwalentem strat energii na oddziaływania z otoczeniem i przesunięcia energetyczne [62];

$V_{df}(E)$ – potencjał oddziaływania wakancji rdzeniowej z fotoelektronem;

W programie FEFF istnieją trzy modele oddziaływania dziury rdzeniowej z fotoelektronem i są one uwzględnione w potencjale: reguła stanu końcowego (ang. *Final State Rule*), szczególnie skuteczna dla wakancji w głębokich stanach rdzeniowych [63], przybliżenie RPA (ang. *Random Phase Approximation*), w którym ekranowanie fotoelektronu od dziury rdzeniowej jest oparte o funkcję dielektryczną [64] oraz brak oddziaływania. Teoria wielokrotnego rozpraszania zakłada, że równanie własne (III.2) można przekształcić definiując lokalne sferyczne potencjały atomowe $v_R(\vec{r})$:



$$V_c(E) + V_{df}(E) + \Sigma(E) = \sum_R v_R(\vec{r} - \vec{R}) \quad (III.3)$$

Jest to tak zwane przybliżenie „potencjałów miseczkowych” (ang. *muffin tin approximation*).

Idea potencjału miseczkowego pokazana jest na Rys. III. 2. Oczywiście jest to założenie, gdyż potencjał wokół atomów nie jest idealnie sferyczny, co więcej pomiędzy atomami również nie jest stały. Dodatkowo potencjały sąsiadujących ze sobą atomów mogą się nakładać w nierównym stopniu.

Rysunek III. 2 Potencjały miseczkowe wokół dwóch rodzajów atomów zaznaczonych kolorem zielonym i niebieskim. Przerzywane linie oznaczają umowną granicę sferycznego potencjału. Żółty kolor oznacza przestrzeń międzyatomową o stałej wartości potencjału.

Należy o tym szczególnie pamiętać przy obliczeniach widm XANES. Nakładanie się potencjałów atomowych może być sterowane z programu FEFF i domyślnie wynosi 15%. Jednakże zaletą tego potencjału jest fakt, iż funkcje Greena mogą się faktoryzować na część radialną i zależną od orbitalnego momentu pędu L [65].

B. Propagator Greena

Fotoelektron można opisać, jako jednocząstkową funkcję Greena w przestrzeni rzeczywistej [62]:

$$G(\vec{r}, \vec{r}', E) = \frac{\langle \varphi''_{foto}(\vec{r}) | \varphi''^*_{foto}(\vec{r}') \rangle}{E - E_{foto} + i\Gamma} \quad (III.4)$$

gdzie: Γ – poszerzenie stanu końcowego.

W celu uproszczenia, można sfaktoryzować funkcje falowe w Złotej Regule Fermiego (II.5), aby podzielić je na część od elektronów atomu, których jest $N-1$ i od fotoelektronu [62]. Korzystając z zależności między funkcją Greena, a macierzą gęstości obsadzeń: $Im[G(\vec{r}, \vec{r}', E)] = -\frac{1}{\pi}\rho(\vec{r}, \vec{r}', E)$, można wyeliminować sumowanie po stanach końcowych, a wykorzystując założenie o potencjałach miseczkowych otrzyma się wyrażenie [55,65]:

$$\mu(E) \sim -\frac{2}{\pi} S_0^2 Im \left\{ \sum_{\varphi_{foto,L,L'}} \langle \varphi_{foto} | d^\dagger | \varphi_{foto,L} \rangle G_{LL'}(\hbar\omega + E) \langle \varphi_{foto,L'} | d | \varphi_{foto} \rangle \theta_H(E - E_{Fermi}) \right\} \quad (III.5)$$

W powyższym wzorze $G_{LL'}$ jest to jednoelektronowy propagator w potencjale rozpraszającym. Obok wyznaczenia potencjałów atomowych, wyznaczenie tego propagatora jest kluczowym elementem działania programu FEFF.

C. Wielokrotne rozpraszanie [55]

Na propagator $G_{LL'}$ składają się dwa człony pochodzące od: atomu centralnego i atomów rozpraszających. Propagator Greena atomu centralnego ma wyrażenie analityczne [61,62], natomiast propagator Greena atomów rozpraszających $G_{LL'}^R$, można rozpisać jako [66]:

$$G_{LL'}^R = [G^0 + G^0 T G^0 + G^0 T G^0 T G^0 + \dots]_{LL'} \quad (III.6)$$

gdzie: T – operator całkowitego rozpraszania;

G^0 – propagator cząstki swobodnej z zespoloną energią własną (wzór (III.5));

Wyrażenie (III.6) opisuje rozwinięcie ścieżek (ang. *path expansion*) służące do wyliczania kolejnych ścieżek rozproszeń w widmie EXAFS. Kolejne człony powyższego równania opisują rozpraszania coraz wyższych rzędów poczynając od 1. Macierz operatora T jest powiązana z operatorem całkowitego potencjału atomowego V , na który składają się poszczególne potencjały atomowe (III.3) uzbieźniane w procedurze Pola Samouzgodnionego (ang. *Self-Consistency Field, SCF*). Z kolei potencjał V jest sumą potencjałów atomowych zdefiniowanych w (III.3). Poprzez parametr $\Sigma(E)$ zwany potencjałem korelacyjno-wymiennym, można wpływać na oddziaływania między atomami, a tym samym na całkowity potencjał i macierz T . Jak można zauważyć, sumowanie przebiega dla kolejnych wartości momentu pędu. W praktyce wartość l około 20 wystarcza do poprawnego wyznaczenia całego widma EXAFS w programie FEFF. Operator T zawiera w sobie możliwe rozproszenia mogące wystąpić w otoczeniu atomu, przez co $G_{LL'}^R$ zawiera wszystkie możliwe rozproszenia dla wszystkich momentów pędu od 0 do L . Ze względu na szybko malejące elementy macierzowe T dla wysokich energii, daleko od krawędzi absorpcji obliczenia dobrze się uzbieźniają. Jednakże w pobliżu krawędzi absorpcji powyższe podejście często zawodzi ze względu na bardzo silne rozpraszanie od krótkich wiązań i małych pędów fotoelektronu [61,66].

Wymusza to uwzględnienie większej ilości ścieżek rozpraszania i prowadzi do formalizmu Pełnego Wielokrotnego Rozpraszania (ang. *Full Multiple Scattering, FMS*). W tej metodzie w wąskim zakresie energetycznym wokół krawędzi absorpcji: około 30-50 eV i dla niskich wartości momentu pędu sumowane są wszystkie rozproszenia. Matematycznie, w programie FEFF propagator (III.6), który ma formę szeregu geometrycznego, jest sumowany do nieskończoności [55,59–62,65]:

$$G_{LL'}^R = [(1 - G^0 T)^{-1} G^0]_{LL'} \quad (\text{III.7})$$

Obliczenia są ograniczone do kilku Angströmów wokół atomu absorbującego tak, aby ograniczyć grupę atomów do zakresu między 50 a 100 oraz ze względu na rozmiar macierzy T.

**D. Obliczanie funkcji IDOS, widm XAS i XES w formalizmie MS/FMS [61]
za pomocą programu FEFF 9.6 [60]**

Podczas obliczania widm XAS i XES w formalizmie MS/FMS program FEFF uwzględnia również czas życia wakancji rdzeniowej oraz poszerzenie aparaturowe. Dla widma XAS, dokonuje tego na drodze konwolucji obu poszerzeń z teoretycznym współczynnikiem absorpcji (III.5) w granicach od E_F do nieskończoności:

$$\tilde{\mu}(E) = \int_{E_F}^{\infty} dE' \mu(E') \cdot \frac{K}{\pi[(E-E')^2 + K^2]} \quad (\text{III.8})$$

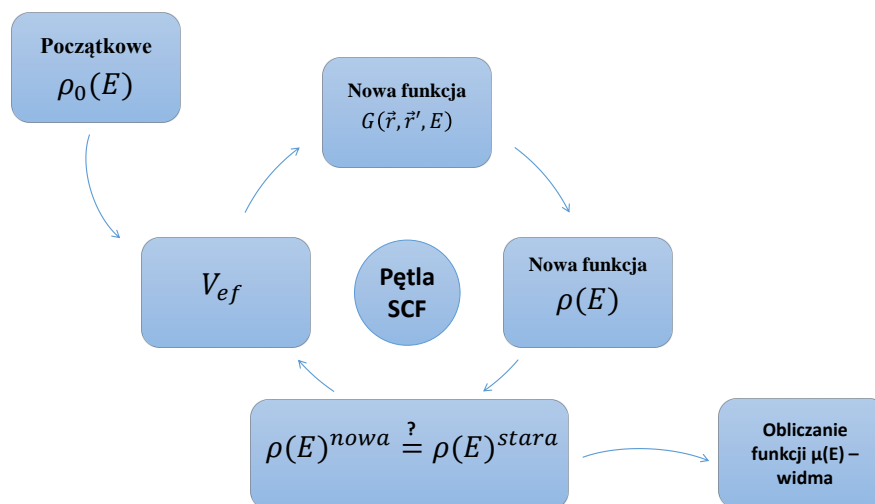
gdzie K – suma poszerzenia aparaturowego i czasu życia wakancji rdzeniowej.

Aby otrzymać widmo XES należy odwrócić granice całkowania. Funkcje gęstości stanów elektronowych w programie FEFF wyznacza się za pomocą wyrażenia [61]:

$$\rho(E) = -\frac{2}{\pi} \text{Im} \int d^3r G(\vec{r}, \vec{r}', E) \quad (\text{III.9})$$

W zależności od granic całkowania wyrażenie (III.9) podobnie jak w przypadku (III.8) daje w wyniku różne obszary energetyczne funkcji.

Obliczenia w programie są prowadzone w pętli SCF w przestrzeni położenia. Ogólny schemat działania kodu programu FEFF przedstawiony jest na Rys. III. 3. Na początku, na podstawie wbudowanych modeli program tworzy początkowy model i oblicza pierwotne gęstości stanów elektronowych. Następnie przechodzi do pętli (SCF), w której dla obliczonej gęstości stanów wyznacza potencjał efektywny i dzieli go na potencjały atomowe (wzór (III.3)). Dla takiego potencjału oblicza nową funkcję Greena i propagator Greena (wzór (III.7)), a na jego podstawie nowe gęstości stanów (wyrażenie (III.9)). Następnie, algorytm porównuje nową gęstość stanów z poprzednią i jeżeli występują istotne różnice, wówczas od nowa wyznacza potencjał efektywny, a pętla się zamyka. Natomiast, jeżeli nie ma istotnych różnic między

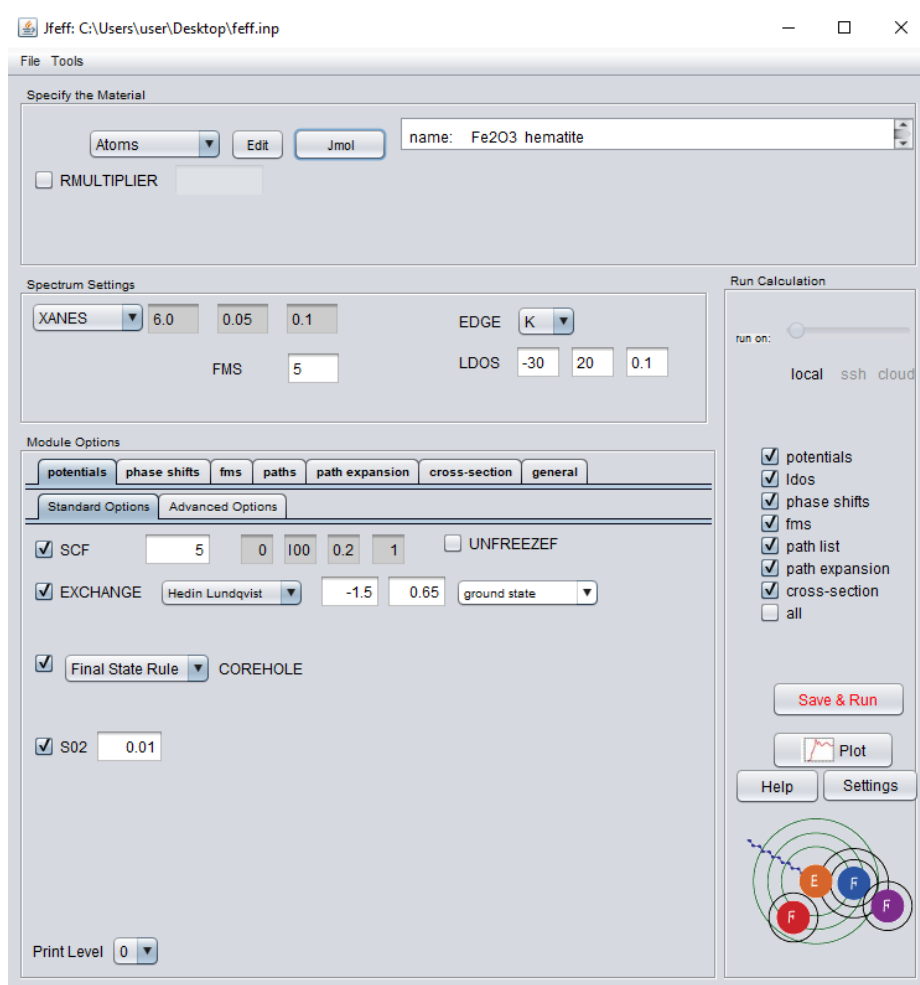


Rysunek III. 3 Zarys działania programu FEFF 9.6.

następującymi po sobie iteracjami obliczeń gęstości stanów elektronowych, wówczas program oblicza widmo (wzory (III.5) oraz (III.8)).

Dzięki zastosowanej teorii możliwe było podzielenie kodu programu FEFF na moduły obliczające: potencjały atomowe, przesunięcia fazowe, przekroje czynne, gęstości stanów, widma, ścieżki rozpraszania. Interfejs graficzny (ang. *Graphical User Interface, GUI*) programu FEFF 9.6 pokazany jest na Rys. III. 4. Do najbardziej podstawowego działania, program potrzebuje jedynie pliku wejściowego zawierającego informacje o tym, dla jakiej krawędzi absorpcji będą prowadzone obliczenia oraz podstawowe parametry tych obliczeń.

Na szczególną uwagę zasługuje karta EXCHANGE, która parametryzuje potencjał korelacyjno-wymienny opisany wcześniej. Jest to karta mająca największy wpływ na końcowy wynik obliczeń. Przyjmuje ona cztery parametry opisujące kolejno: rodzaj modelu potencjału, przesunięcie poziomu Fermiego w [eV], poszerzenie widma w [eV] oraz model tła oddziaływania. Dostępne potencjały korelacyjno-wymienne to: Hedina-Lundqvista, Diraka-Hary, ich kombinacja, stan podstawowy oraz potencjał częściowo zdelokalizowany (ang. *partially nonlocal*). Taki sam wybór oferuje program do modelowania tła oddziaływania. Z reguły jednak potencjał stanu podstawowego jest dobrym modelem tła oddziaływania do obliczania widm XANES. Z kolei drugi parametr w karcie EXCHANGE, oznaczony w programie jako *vr0* jest to przesunięcie poziomu Fermiego. Ze względu na przyjętą w programie procedurę SCF, niedokładność oszacowania poziomu Fermiego wynosi od 1 eV do 3 eV. Trzeci parametr karty EXCHANGE *vr1*, jest to poszerzenie widma, składowa parametru Γ we wzorze (III.5). Odpowiada za poszerzenie stanu końcowego i widma wynikające z przyjętej metody pomiarowej oraz oddziaływania korelacyjno-wymiennego.



Rysunek III. 4 Interfejs graficzny programu FEFF 9.6 z wczytanym plikiem wejściowym do obliczenia widma XANES hematytu.

III. 3 Uwzględnienie efektu samoabsorpcji w widmach *ab-initio*

Mając do dyspozycji widmo teoretyczne obliczone w programie FEFF należy je porównać z eksperymentalnym w celu oceny poprawności obliczeń. W tym celu, aby uniknąć konieczności dodatkowego modyfikowania danych eksperymentalnych, można dodać efekt samoabsorpcji do widm teoretycznych nieobciążonych nim.

Prosty model oddziaływania wiązki promieniowania X o punktowym przekroju z próbką pokazany jest na Rys. III. 5. Ponadto, dla uproszczenia założono, że wiązka padająca $I_0(E)$ i wiązka emitowana $I_f(E)$ padają pod kątami wynoszącymi $\alpha = 45^\circ$. Wiązka $I_0(E)$ wnika w próbkę o grubości d , pokonując drogę optyczną a . Natężenie promieniowania po przejściu całej drogi optycznej wynosi:

$$I_1(E) = I_0(E)e^{-a\mu_{tot}(E)\rho} \quad (\text{III.10})$$

gdzie: $\mu_{tot}(E)$ – całkowity współczynnik absorpcji promieniowania w funkcji energii.

Na drodze a zaabsorbowane zostaje promieniowanie o intensywności:

$$I_{abs}(E) = I_0(E) - I_1(E) = I_0(E)(1 - e^{-a\mu_{tot}(E)\rho}) \quad (III.11)$$

Jednocześnie można wyznaczyć intensywność promieniowania fluorescencyjnego, które dotarło do detektora z infinitezimalnego odcinka drogi optycznej próbki da . Drogę optyczną można przeliczyć na grubość próbki: $da = \frac{\sqrt{2}}{2} dx$. Na ten efekt składają się dwa inne: padająca wiązka wytwarza promieniowanie fluorescencyjne, które następnie jest absorbowane ponownie przez próbkę:

$$I_F(E)dx = I_{abs}(E)e^{-2\sqrt{2}dx\mu_{tot}(E_F)\rho} = I_0(E)(1 - e^{-2\sqrt{2}dx\mu_{tot}(E)\rho})e^{-2\sqrt{2}dx\mu_{tot}(E_F)\rho} \quad (III.12)$$

gdzie: $\mu_{tot}(E_F)$ – całkowity współczynnik absorpcji promieniowania dla energii fluorescencji E_F ;

Na potrzeby obliczeń założono, że dla krawędzi absorpcji K energia fluorescencji jest tożsama z energią linii $K\alpha_1$. Wykonując całkowanie po dx otrzyma się wyrażenie na nową intensywność fluorescencji, uwzględniającą efekt samoabsorpcji:

$$I_F(E) = 2\sqrt{2} \left[\frac{1}{A}(1 - e^{-dA}) - \frac{1}{B}(1 - e^{-dB}) \right] \quad (III.13)$$

gdzie: $A = 2\sqrt{2}\mu_{tot}(E)\rho$;

$B = 2\sqrt{2}\mu_{tot}(E_F) \cdot A$;

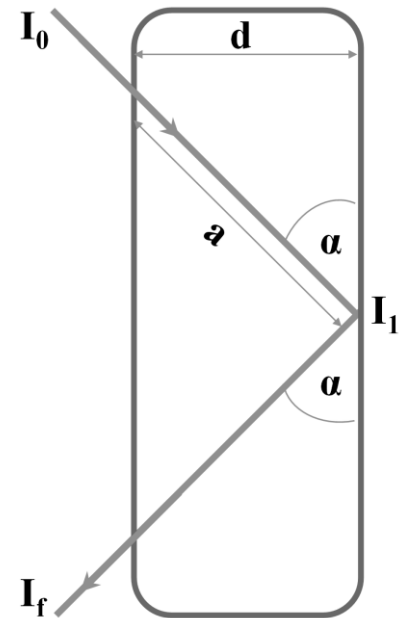
ρ – uśredniona gęstość materiału;

d – grubość próbki;

$\mu_{tot}(E)$ – widmo XAS;

$\mu_{tot}(E_F)$ – całkowity współczynnik absorpcji dla energii, przy której prowadzona była akwizycja danych.

Do celów analizy wyników napisany został przez Autora rozprawy program w języku C++ wykonujący korektę samoabsorpcji na widmach obliczonych teoretycznie w programie FEFF i wykorzystujący równanie (III.13). Kod programu znajduje się w załączniku do niniejszej rozprawy. Widma teoretyczne muszą być znormalizowane zgodnie z wartościami przebiegu współczynnika absorpcji $\mu_{tot}(E)$ przed i za krawędzią absorpcji. Współczynnik absorpcji można wyznaczyć



Rysunek III. 5 Model oddziaływania wiązki padającej i wtórnej fluorescencji z próbką. Oznaczenia znajdują się w tekście.

za pomocą np. tablic Narodowego Instytutu Standaryzacji i Technologii (ang. *National Institute of Standards and Technology, NIST*) [67]. Program na wejściu przyjmuje plik w formacie ASCII zawierający dwie kolumny: z energią w [eV] i z wartościami współczynnika absorpcji wyznaczonego *ab-initio* i znormalizowanego. W toku działania programu można również wybrać grubość próbki. Jako wynik program tworzy widmo, w takim samym formacie jak wejściowy, które należy ponownie znormalizować. Program stanowi załącznik do niniejszej Pracy.

III. 4 Obliczanie map RXES

Mapa RXES zebrana przy krawędzi absorpcji pierwiastka jest to konwolucja widm XAS i XES w wąskim zakresie energetycznym wokół tej krawędzi. Rezonansowa emisja rentgenowska jest procesem koherentnym co oznacza, iż niemal jednocześnie zachodzi absorpcja i emisja fotonu. Zatem w eksperymencie można otrzymać widma nieobarczone poszerzeniem wynikającym ze skończonego czasu życia stanu końcowego.

Aby obliczyć potrzebne mapy RXES dla danego związku chemicznego wyznaczano najpierw widma XAS i XES nieobarczone poszerzeniem aparaturowym wykorzystując program FEFF 9.6. W celu usunięcia jakiegokolwiek poszerzenia aparaturowego i zredukowania poszerzenia pochodzącego od czasu życia stanu końcowego w procesie rezonansowej emisji rentgenowskiej w karcie EXCHANGE wartość parametru *vr1* była dobierana nieznacznie poniżej 0 eV. Konwolucji widm dokonano w programie napisanym w pakiecie Mathematica 11, na podstawie teorii opisanej w rozdziale II.2 i wzoru (II.14):

$$\frac{d\sigma(\omega)}{d\omega'} = 2\pi r_0^2 \int \frac{\omega' (\omega_{1s} - \omega_{np}) g_{np \rightarrow 1s}(\omega_{1s} + \omega'') \frac{dg_{1s}}{d\omega''}}{\omega (\omega_{1s} + \omega'' - \omega)^2 - \left(\frac{\Gamma_{1s}}{2\hbar}\right)^2} \cdot \frac{\Gamma_{np}/2\hbar}{(\omega - \omega_{np} - \omega'' - \omega')^2 + \left(\frac{\Gamma_{np}}{2\hbar}\right)^2} d\omega'' \quad (\text{III.14})$$

gdzie: $\hbar \omega_{1s}$ i $\hbar \omega_{np}$ – energie stanu podstawowego i końcowego;

$\hbar \omega$ i $\hbar \omega'$ – energie padającej i rozproszonej wiązki promieniowania X;

$g_{1s \rightarrow np}$ – siła oscylatora przejść między stanami końcowymi a początkowymi;

$\frac{dg_{1s}}{d\omega''}$ – funkcja opisująca prawdopodobieństwo wzbudzenia atomu w procesie absorpcji;

Γ_{1s} – jest to czas życia dziury rdzeniowej.

Funkcja $\frac{dg_{1s}}{d\omega''}$ jest bezpośrednio powiązana z wartościami $\mu(E)$ w widmie XAS [33].

W szczególności, mając widma XAS wyznaczone metodą *ab-initio* przy zerowym poszerzeniu eksperymentalnym i zachowaniu jedynie czasu życia stanów Γ_{1s} i Γ_{np} można

zastąpić funkcję $\frac{dg_{1s}}{d\omega''}$ obliczonym widmem teoretycznym. Analogicznie, funkcja $g_{np \rightarrow 1s}$ w pierwszym przybliżeniu może być zastąpiona funkcją XES obliczoną metodą *ab-initio* przy braku poszerzenia aparaturowego i zachowaniu jedynie szerokości stanów Γ_{1s} i Γ_{np} . Gdy przeprowadzi się sumowanie po energii padającej i energii emisji, dobierając odpowiednio zakresy oraz krok, wówczas odtworzy się mapę RXES badanego związku:

$$\frac{d\sigma(E)}{dE'} = 2\pi r_0^2 \sum_i^N \sum_j^M \int \frac{E'_i (E_{1s} - E_{np}) g_{np \rightarrow 1s}(E_{1s} + E'') \frac{dg_{1s}}{dE''}}{E_j (E_{1s} + E'' - E_j)^2 - \left(\frac{\Gamma_{1s}}{2}\right)^2} \cdot \frac{\Gamma_{np}/2}{(E_j - E_{np} - E'' - E'_i)^2 + \left(\frac{\Gamma_{np}}{2}\right)^2} dE'' \quad (\text{III.15})$$

gdzie: N i M – całkowita ilość punktów z danymi na osiach energii absorpcji i emisji.

W praktyce całka we wzorze (II.14) jest również zastępowana sumą w celu lepszego odtworzenia warunków eksperymentu. W programie napisanym w pakiecie Mathematica, występują dwie podstawowe części: pierwsza, odpowiadająca za wczytanie widma i druga za obliczenie sum i całek (II.14). Krótkiego komentarza wymaga przygotowanie widm wczytanych przez pierwszą część programu do dalszych obliczeń. Widmo XAS musi być dobrze znormalizowane do 0 w części przedkrawędziowej, aby uniknąć artefaktów podczas odtwarzania mapy RXES. Ze względu na dyskretny charakter danych, w celu uniknięcia błędów numerycznych podczas dalszego działania programu, punkty w widmach są interpolowane za pomocą algorytmu interpolacji liniowej tak, aby dane stały się ciągłe. Ponadto wartość 0 eV jest ustalana na połowę wysokości krawędzi absorpcji. Dzięki temu możliwie jest dobranie relatywnej skali energetycznej w obliczeniach, co z kolei ułatwia dobranie odpowiedniej skali całkowania. Oba te zabiegi miały wyłącznie charakter techniczny i nie wpływały na końcowy wynik. Po wykonaniu obliczeń, dane mogą być zapisane w postaci nieznormalizowanej macierzy w pliku *.txt. Kod programu stanowi załącznik do niniejszej rozprawy doktorskiej.

IV. Teza i cele pracy

Dokonując analizy możliwości eksperymentalnych opisanych metod spektroskopowych, postawiono następującą tezę: **„Metoda RXES pozwala na określenie kompletnej elektronowej struktury walencyjnej metali 3d w modelowych układach o zróżnicowanym stopniu złożoności.”**. W celu udowodnienia postawionej tezy, podjęto się wykonania eksperymentów z użyciem technik spektroskopii rentgenowskiej, w tym RXES, na próbkach zawierających różne metale bloku d Układu Okresowego i różny poziom złożoności budowy wewnętrznej.

Zatem zakres prac zaplanowanych w rozprawie obejmował:

- 1) Wykonanie pomiarów RXES próbek referencyjnych związków Fe;
- 2) Wykonanie pomiarów kompleksów białka PrP^C z jonami Cu(II) i Zn(II) metodami XANES i EXAFS;
- 3) Wykonanie pomiarów XAS, XRD, XRF i RXES próbek liposomów poddanych działaniu Cr(VI);
- 4) Opracowanie metodologii analizy danych RXES w oparciu o obliczenia *ab-initio* i zastosowanie jej do układów o niskim stopniu złożoności;
- 5) Opracowanie metodologii analizy danych XAS (XANES) i zastosowanie jej do złożonych i nieuporządkowanych układów;
- 6) Wykorzystanie opracowanych metod pomiarów i analizy danych eksperymentalnych do pomiaru nieuporządkowanego układu złożonego metodą RXES;
- 7) Porównanie możliwości analizy konwencjonalnymi metodami spektroskopii rentgenowskiej z możliwościami metody dyspersyjnej (RXES);

V. Struktura elektronowa referencyjnych związków żelaza otrzymana metodą RXES [34]

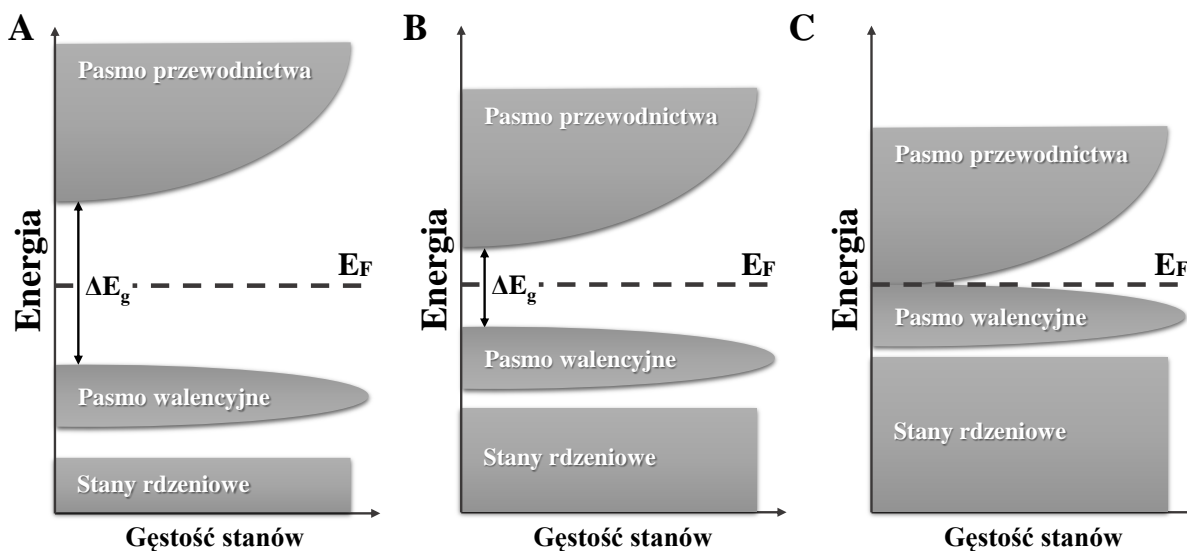
V.1 Wstęp

Eksperymenty mające na celu poznanie struktury elektronowej różnych materiałów od wielu lat są jednym z głównych typów aktywności naukowej w dziedzinie fizyki ciała stałego. Struktura elektronowa badanego materiału obejmuje zarówno konfiguracje elektronową rdzenia atomowego badanego pierwiastka, jego walencyjne oraz nieobsadzone stany elektronowe. Dodatkowo, spośród stanów nieobsadzonych możemy wyróżnić stany związane oraz tak zwane stany w Kontinuum. Jak zostało to opisane w Rozdziale II, stany obsadzone pierwiastka można zbadać przy użyciu metody XES, z kolei stany nieobsadzone można próbować metodą XAS, na którą składają się spektroskopie XANES i EXAFS badające odpowiednio nieobsadzone stany związane i stany w Kontinuum. Jednakże, pełny obraz struktury elektronowej można również otrzymać przy użyciu metody RXES.

Żelazo (łac. *ferrum*) o symbolu chemicznym Fe jest znane ludziom od około 5000 lat [68]. Znajduje się w 8 grupie Układu okresowego i 4 okresie, w bloku d pierwiastków przejściowych. Jest jednym z najczęściej występujących pierwiastków w otoczeniu człowieka: występuje ono głównie w formie nierozpuszczalnych w wodzie tlenków, minerałów oraz wielu czynników zanieczyszczających środowisko [69]. Żelazo występuje też w licznych związkach biologicznie czynnych np. białkach i hemie. Spośród licznych przykładów białek, warto wymienić enzymy zawierające żelazo w centach aktywnych np. hydrogenazę [70] lub katalazę [70]. Enzymy dzięki swojej nietypowej konstrukcji są bardzo silnymi katalizatorami reakcji biochemicznych. Poznanie struktury ich miejsc aktywnych na poziomie elektronowym jest często konieczne, aby zrozumieć naturę ich niezwykłych właściwości. Należy również wspomnieć, że żelazo nie zawsze ma pozytywne działanie na układy biologiczne. W szczególności, może prowadzić do generowania wolnych rodników, lub brać udział w dobrze znanej i szkodliwej reakcji Fentona [71,72]: $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + HO^- + HO^\bullet$.

Tlenek żelaza występuje naturalnie między innymi w formie hematytu romboedrycznego, α - Fe_2O_3 , kubicznego γ - Fe_2O_3 oraz magnetytu Fe_3O_4 , który posiada strukturę odwróconego spinela o wzorze $Fe^{(III)}[Fe^{(II)}Fe^{(III)}]O_4$ [73].

W celu opisanego właściwości elektrycznych ciał stałych, na gruncie mechaniki kwantowej powstała tzw. Pasmowa Teoria Przewodnictwa. W szczególności, strukturę elektronową każdego pierwiastka lub związku chemicznego na skali energetycznej można podzielić na pasmo walencyjne i pasmo przewodnictwa oddzielone przerwą energetyczną. Schematycznie pokazane jest to na Rys. V. 1. Poziom Fermiego jest to energia ostatniego związanego przez atom fermionu. W przypadku izolatorów i półprzewodników E_F wypada w połowie wartości ΔE_g . W zależności od istnienia i rozmiaru przerwy energetycznej (ΔE_g) oraz jej położenia względem Energii Fermiego (E_F), klasyfikuje się badane związki na izolatory (Rys. V. 1 A), półprzewodniki (Rys. V. 1 B) oraz przewodniki (metale, Rys. V. 1C). Odpowiada to kolejno dużej, małej i zerowej wartości ΔE_g oraz nachodzeniu się pasm. Wartości ΔE_g mogą być różne, wahają się w przedziale od 0 do ok. 3 eV, chociaż mogą występować wyjątki jak na przykład AlN,, dla którego $\Delta E_g = 6,12$ eV [74]. Z punktu widzenia pasmowej teorii przewodnictwa, tlenki żelaza są półprzewodnikami, np. α -Fe₂O₃ ma przerwę energetyczną równą 2,2 eV [75]. Fe₂O₃ można domieszkować lub wytwarzać w różnych formach zmieniając znacznie wartości ΔE_g [76–79]. Na przykład na podstawie cienkich filmów z α -Fe₂O₃ stworzono fotoanodę w systemie utleniania wody osiągającą wydajność do 40 % [80].



Rysunek V. 1 Schemat pasm energetycznych dla (A) Izolatora (B) Półprzewodnika (C) Przewodnika. Pasmowa teoria przewodnictwa zakłada istnienie pojedynczych stanów energetycznych elektronów w postaci funkcji falowych, które leżąc blisko siebie nakładają się tworząc pasma: walencyjne i przewodnictwa. Pasma te są oddzielone obszarem wzbronionym scharakteryzowanym wartością przerwy energetycznej. Wartość przerwy energetycznej oraz położenie pasm względem Energii Fermiego (przerwana linia) decydują o własnościach elektrycznych danego związku chemicznego.

Dotychczas, związki żelaza w tym tlenki badane były przy użyciu zróżnicowanych metod eksperymentalnych, łącznie ze spektroskopią Mössbauera [81] oraz spektroskopią promieniowania X [24,36,82]. Na przykład, za pomocą metody XANES przy krawędzi absorpcji K żelaza, wykonano szczegółową analizę struktury przedkrawędziowej oraz stopnia utlenienia na bazie położenia krawędzi absorpcji związków żelaza w szklach [83] oraz tkankach zastawki aortalnej w zaawansowanej fazie stenozы [84]. Z kolei przy użyciu metody XES zbadano stany spinowe $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ [85] oraz bardziej skomplikowanych kompleksów żelaza na +2 i +3 stopniu utlenienia [23,24]. Wykazano przy tym dużą czułość linii $K\beta_{1,3}$ żelaza na stopień utlenienia i wartość spinu. Ponadto, wykazano przewagę metody XES nad EXAFS: ta pierwsza okazała się być w stanie rozróżnić lekkie atomy takie jak C, N, O na podstawie położenia i kształtu linii $K\beta''$. Jednocześnie obszar walencyjny widma XES wykazał dużą czułość na zmiany geometrii wokół atomu centralnego.

Dzięki rozwojowi trzeciej generacji źródeł Promieniowania Synchrotronowego o wysokiej intensywności oraz zaawansowanych spektrometrów, można wykonać pomiary wykorzystując drugorzędowe efekty optyczne takie jak RXES. Dzięki temu, że proces wzbudzenia i deekscytacji jest koherentny, poszerzenie sygnału ze względu na skończony czas życia dziury rdzeniowej jest zredukowany. Pozwala to na wykonanie jednoczesnego pomiaru widm XAS i XES związków żelaza i otrzymanie informacji o stanach elektronowych, których nie widać w widmach fluorescencyjnych ze względu na naturalny kształt linii widmowej.

V. 2 Opis eksperymentu

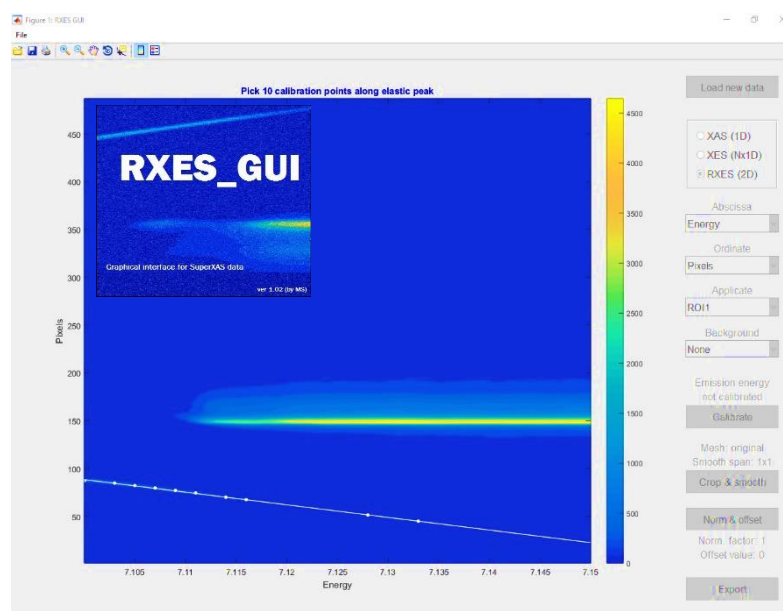
W trakcie eksperymentu metodą RXES zostały zmierzone trzy związki żelaza reprezentujące trzy typy przewodnictwa elektrycznego: folia żelazna o grubości 0,5 mm, $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ w postaci proszku oraz $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \times 9 \text{H}_2\text{O}$ w postaci kryształów, które były kolejno przewodnikiem, półprzewodnikiem i izolatorem. Wszystkie odczynniki zostały zakupione z firmy Sigma-Aldrich. Hematyt i azotan (V) żelaza (III) zostały uformowane do postaci pastylek o grubości około 2 mm.



Rysunek V. 2 Widok układu pomiarowego przygotowanego do kalibracji energetycznej, na linii SuperXAS, SLS, PSI. W układzie nie ma zamontowanego kryształu analizującego.

Pomiary zostały wykonane na stacji eksperymentalnej SuperXAS (X10DA) synchrotronu Swiss Light Source w Paul Scherrer Institut (Villigen) w Szwajcarii. Rys. V. 2 pokazuje układ pomiarowy we wnętrzu komory pomiarowej, który jest przygotowany do kalibracji energetycznej. Wiązka została otrzymana w oparciu o magnes zakrzywiający o polu magnetycznym równym 2,9 T jako urządzenie dostarczające promieniowanie. Strumień fotonów wynosił około $10^{12} f/s$, a wiązka była skupiona przy użyciu lusterek toroidalnych pokrytych warstwami platyny i rodu. Dobór energii padającej na próbkę odbywał się poprzez przestawianie monochromatora z podwójnym kryształem Si(111) (ang. *Double Crystal Monochromator*, DCM). Pomiar promieniowania był dokonany przy pomocy dyspersyjnego spektrometru w geometrii von Hamosa z segmentowym kryształem analizującym [86] i dwuwymiarowego detektora promieniowania X typu PILATUS w zakresie energetycznym

7100 – 7150 eV z krokiem 1 eV. Widma emisyjne były rejestrowane w zakresie energetycznym 6800 – 7160 eV. Końcowa rozdzielczość każdego pomiaru była obliczana na podstawie szerokości połówkowej (FWHM) funkcji Gaussa dopasowanej do eksperymentalnie otrzymanego piku elastycznego. Ostatecznie, całkowita rozdzielczość energetyczna pomiaru wyniosła 1,5(5) eV, na co złożyła się niepewność pochodząca od spektrometru promieniowania X wynosząca 1,1(1) eV oraz od szerokości wiązki padającej wynosząca 1,0(5) eV. Niepewność intensywności widm obliczana była jako $\sqrt{N_i}$, gdzie N_i oznacza intensywność sygnału w danym punkcie i w widmie rentgenowskim otrzymanym z niemodyfikowanej w żaden sposób mapy RXES. Mapy RXES były kalibrowane w programie RXES_GUI [87]. Wszystkie dopasowania funkcji teoretycznych do danych eksperymentalnych były wykonywane metodą najmniejszych kwadratów w przypadku funkcji liniowej oraz Levenberg’a–Marquardt’a w programie OriginPro 9.1. Jest to algorytm, który jest odpowiednikiem metody najmniejszych kwadratów stosowanej powszechnie do dopasowywania funkcji liniowych.

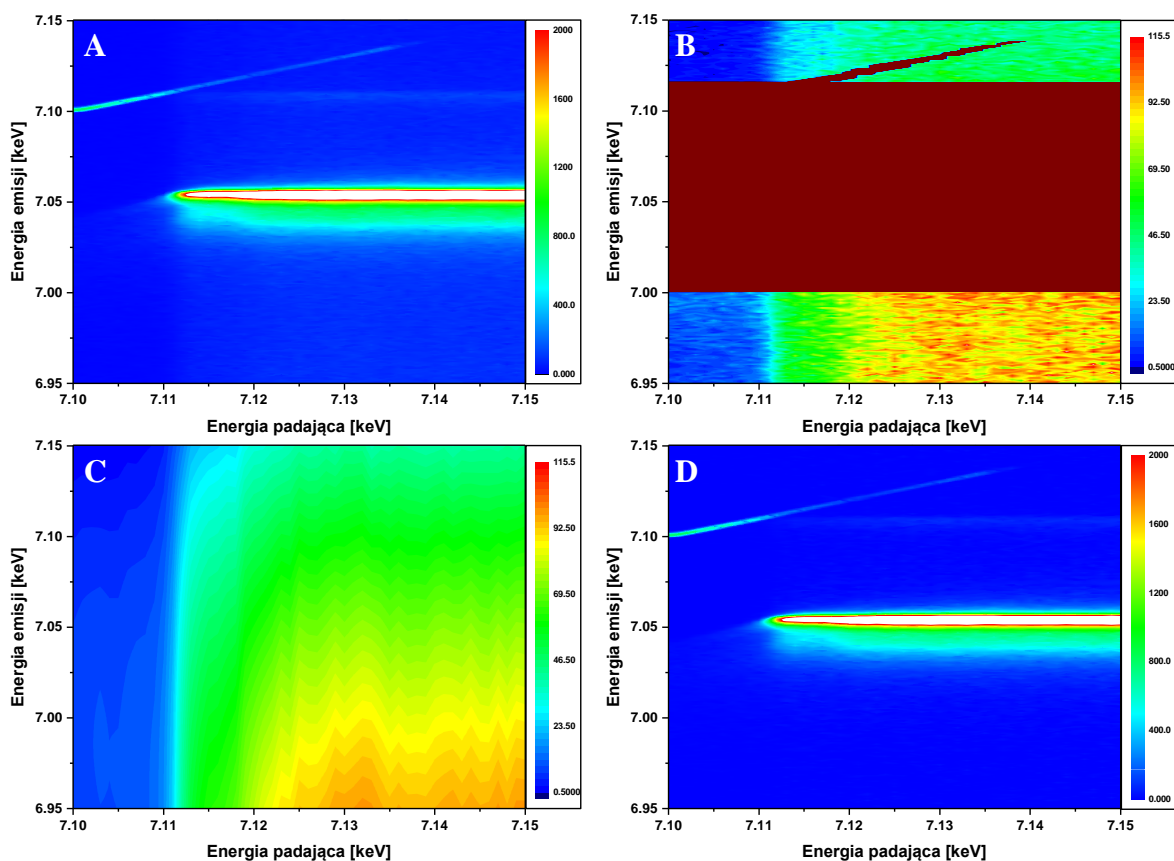


Rysunek V. 3 Widok programu RXES_GUI podczas kalibracji mapy RXES dla folii żelaznej. Insert przedstawia logo programu.

V. 3 Analiza i wyniki

W trakcie eksperymentu zarejestrowano trzy mapy RXES kolejno dla każdego opisanego powyżej związku chemicznego. Dane po pomiarze otrzymywane były jako macierz, z wartością energii padającej na jednej osi i kanałem energetycznym na drugiej osi. W celu skalibrowania energii emisji, za pomocą dedykowanego dla wiązki SuperXAS programu RXES_GUI należy wykonać dopasowanie krzywej kalibracyjnej do piku elastycznego. W ten sposób dla każdej energii padającej możliwe jest policzenie energii emisji promieniowania. Ze względu na liniowość zależności intensywności przejść od energii emisji, dopasowywany był wielomian rzędu 1, czego efekt jest pokazany na Rys. V. 4 C w postaci profilu tła.

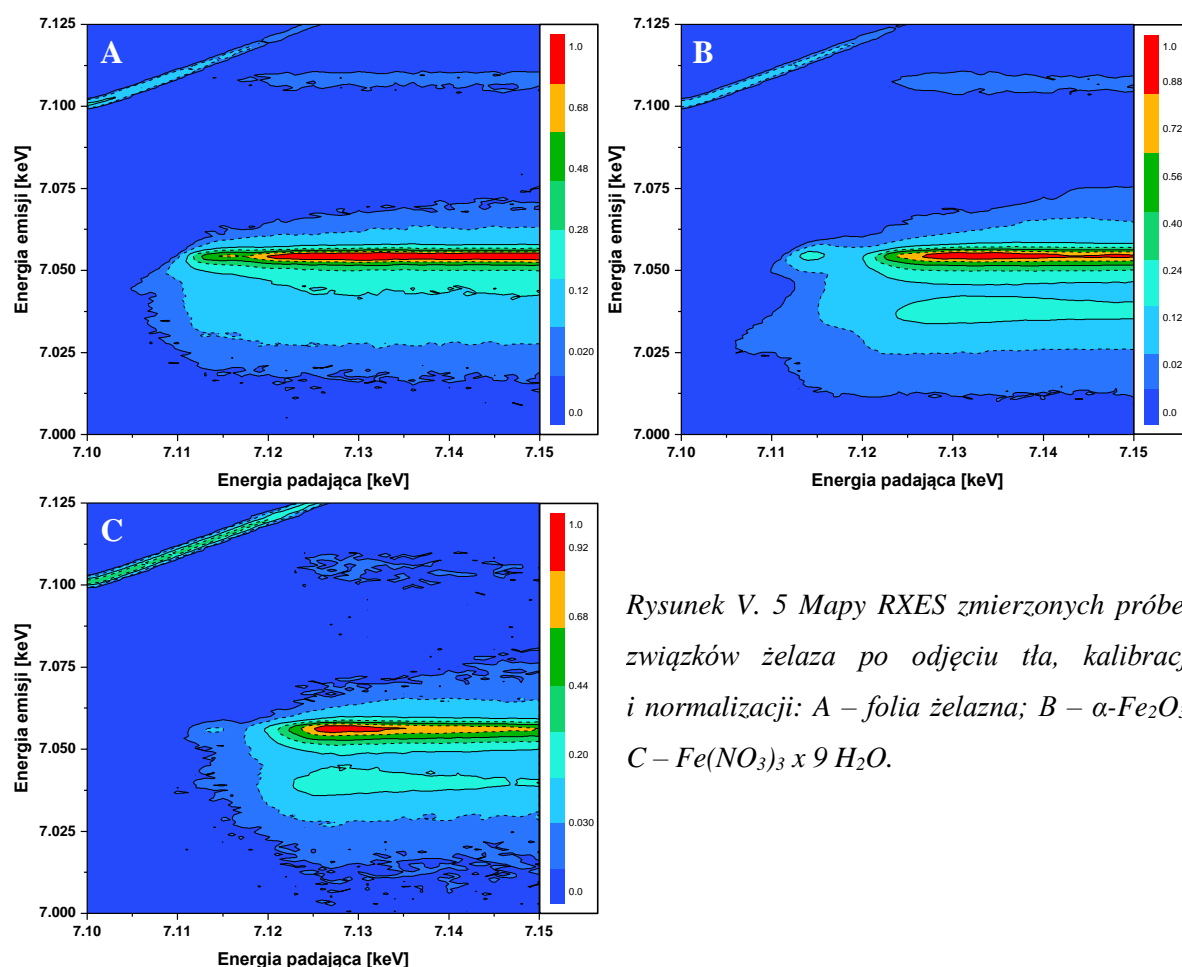
Pierwotnie, nawet skalibrowane mapy RXES były dość zaszumione oraz miały widoczne tło, co znacznie obniżało stosunek sygnału do szumu w rejonie walencyjnym widm emisyjnych. Stało się tak ze względu na niski przekrój czynny zjawiska w rejonie walencyjnym



Rysunek V. 4 Redukcja szumu na mapie RXES na przykładzie wyników otrzymanych dla folii żelaznej: A – dane przed obróbką, bezpośrednio po pomiarze, oraz pojedynczy skan profilu tła dla energii 6970 eV (biała linia); B – dane z wyciętym obszarem zawierającym sygnał fluorescencyjny pochodzący od przejść elektronowych oraz piku elastycznego (kolor bordowy); C – profil zmienności tła otrzymany dla całej mapy; D – mapa RXES po odjęciu profilu zmienności tła .

oraz ze względu na obecność zjawisk towarzyszących takich jak rozpraszanie promieniowania X. W celu redukcji tła, za pomocą dopasowywania odpowiedniej funkcji metodą najmniejszych kwadratów wyznaczono jego profil zmienności, a następnie odjęto tak uzyskane tło od danych eksperymentalnych. Cała procedura zostanie opisana na przykładzie mapy RXES folii żelaznej.

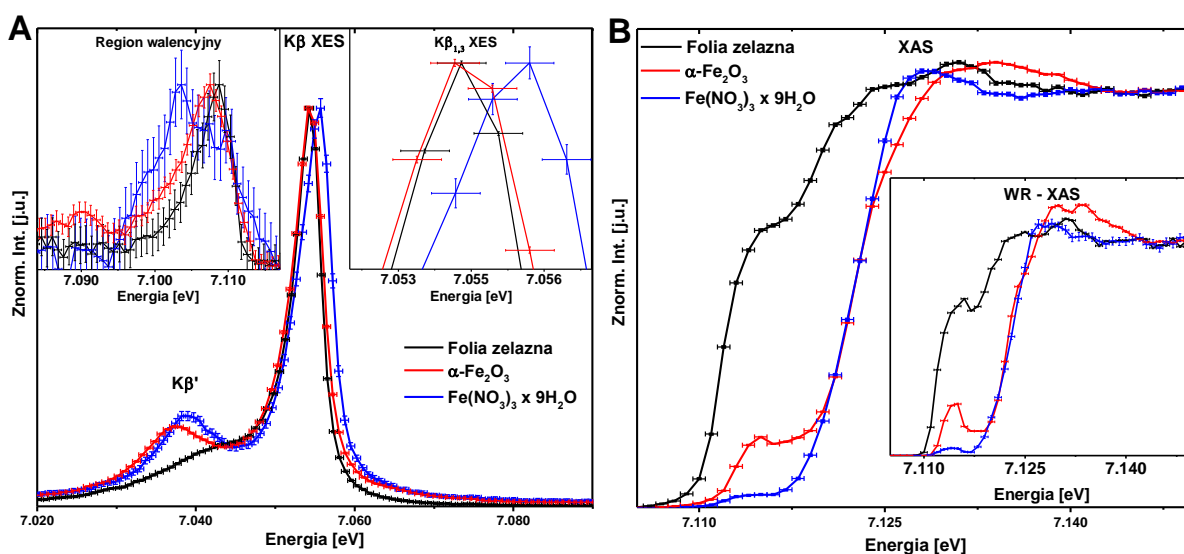
Przykład skalibrowanych danych, bezpośrednio po pomiarze przedstawia Rys. V. 4 A. Dane te są przedstawione w skali bezwzględnej. Dodatkowo zamieszczone jest wycięcie tła dla energii emisji 6970 eV, aby pokazać wkład pochodzący od tła. Z takiej mapy wycięte zostały wszystkie obszary mogące zawierać sygnał fluorescencyjny pochodzący od linii $K\beta'$, $K\beta_{1,3}$, $K\beta_{1,5}$ i $K\beta''$ oraz pików elastycznego (Rys. V. 4 B). Następnie, do wartości intensywności takiej mapy, w kierunku rosnącej energii emisji, dopasowywane były wielomiany 2 stopnia, co w efekcie dało profil zmienności tła pokazany na Rys. V. 4 C. Warto dodać, że wielomiany 1 stopnia niedoszacowywały wartości tła, natomiast wielomiany wyższego stopnia powodowały powstanie artefaktów z powodu lokalnego przeszacowania wartości tła. Na koniec, profil zmienności tła był odejmowany od skalibrowanych danych (Rys. V. 4 A), co w efekcie prowadziło do redukcji tła w danych eksperymentalnych. Efekt ten widać na Rys. V. 4 D. Taka sama procedura kalibracji i redukcji tła danych została zastosowana do wszystkich



Rysunek V. 5 Mapy RXES zmierzonych próbek związków żelaza po odjęciu tła, kalibracji i normalizacji: A – folia żelazna; B – $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$; C – $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \times 9 \text{H}_2\text{O}$.

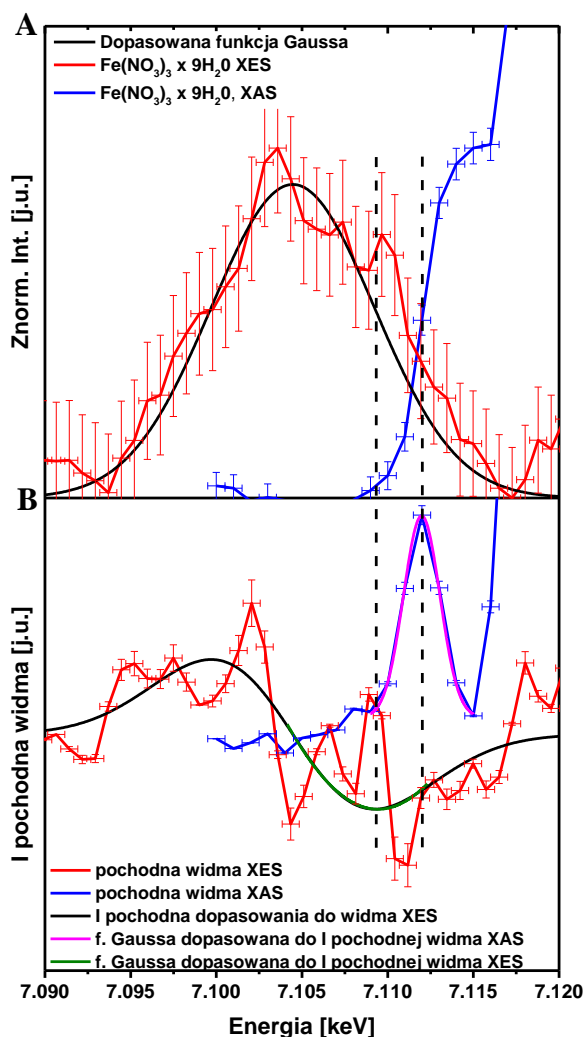
danych eksperymentalnych. Ostatecznie po znormalizowaniu map do maksymalnej wartości na każdej z nich, otrzymano wyniki pokazane na Rys. V. 5 A-C. Mapy w takiej formie, jak pokazane na rysunku Rys. V. 5 posłużyły do dalszej analizie wyników.

Z map na Rys. V. 5 zostały wyznaczone widma rentgenowskie XAS, HR-XAS oraz XES. Ponieważ eksperyment był wykonany w zakresie energetycznym dla widm emisyjnych 6800 – 7160 eV linie $K\alpha$ nie zostały zarejestrowane. W dalszej analizie, widma dla czystego żelaza (Fe^0) będą traktowane jako próbka referencyjna. Na Rys. V. 6 A przedstawiono uzyskane z mapy RXES widma emisyjne: główną linię $K\beta$ oraz obszar walencyjny. W porównaniu do Fe^0 , piki $K\beta_{1,3}$ dla $\alpha-Fe_2O_3$ oraz $Fe(NO_3)_3 \times 9 H_2O$ są przesunięte o kolejno 0 eV i 1.1(7) eV w stronę wyższych energii, co zgadza się z doniesieniami literaturowymi [30]. Odwrotnie zachowały się piki pochodzące od stanów walencyjnych, gdzie widmo dla $Fe(NO_3)_3 \times 9 H_2O$ przesunęło się w stronę niskich energii i które widać na lewym insercie na Rys. V. 6 A. Ponadto, w przypadku widma XES dla $\alpha-Fe_2O_3$ i $Fe(NO_3)_3 \times 9 H_2O$, widać linię satelitarną $K\beta'$. Krawędź absorpcji Fe dla $\alpha-Fe_2O_3$ oraz $Fe(NO_3)_3 \times 9 H_2O$ jest wyraźnie przesunięta względem krawędzi dla Fe^0 w stronę wyższych energii o kolejno 10.8(1.0) eV i 11.2(1.1) eV, co wyraźnie widać na Rys. V. 6 B. Widma XAS tlenku żelaza (III) i azotanu (V) żelaza (III) mają podobną



Rysunek V. 6 A – widma XES wszystkich badanych próbek otrzymane w wyniku wykonania całkowania mapy RXES wzdłuż całej energii padającej promieniowania X. Inset z lewej strony przedstawia regiony walencyjne widm XES wszystkich związków, natomiast inset po prawej stronie przedstawia zbliżenie na maksimum linii $K\beta_{1,3}$ wszystkich związków; B – widma XAS wszystkich badanych próbek otrzymane w wyniku wykonania całkowania mapy RXES wzdłuż całej energii emisji promieniowania X. Inset przedstawia widma wysokorozdzielcze XAS wydobyte z mapy RXES poprzez całkowanie intensywności fluorescencji dla energii emisji 7,055 keV. Słupki błędów oznaczają niepewności zdefiniowane jako pierwiastek z wariancji.

strukturę krawędzi absorpcji, zwłaszcza w obszarze wartości E_0 , jednakże na insercie Rys. V. 6 B widma HR-XAS tych związków wykazują widoczne różnice. Wynika to z faktu, iż widma HR-XAS zostały otrzymane przez całkowanie mapy RXES dla pojedynczej energii emisji równej 7,055 keV, która odpowiada maksimum pików $K\beta_{1,3}$. Oznacza to, że wkład do naturalnego kształtu linii widmowej pochodzący od skończonego czasu życia dziury rdzeniowej został zredukowany. Pozwoliło to na otrzymanie bardziej szczegółowych różnic w widmach absorpcyjnych w przypadku $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ i $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \times 9 \text{H}_2\text{O}$, wynikających z różnego



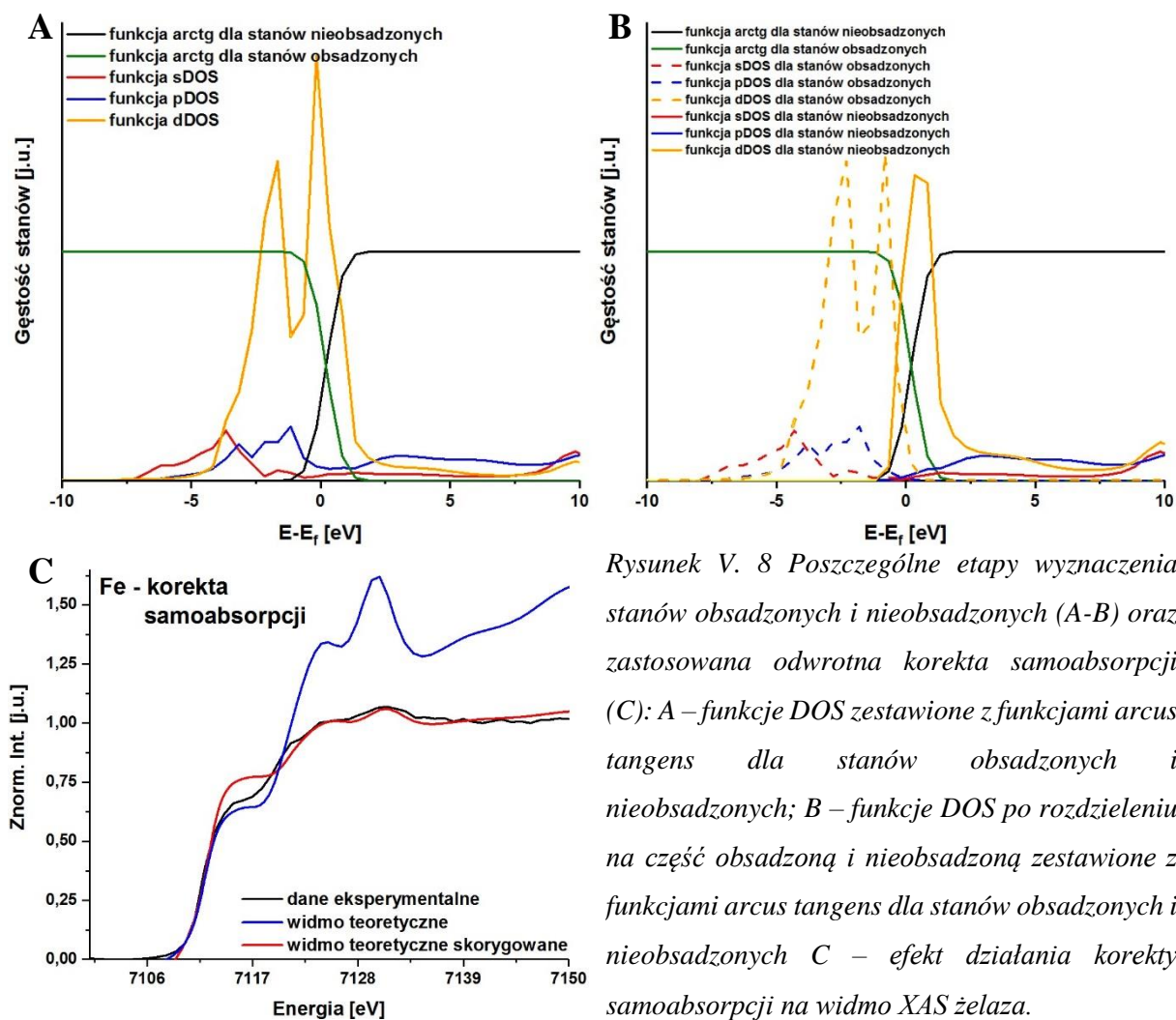
Rysunek V. 7 Identyfikacja szerokości przerwy energetycznej dla $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \times 9 \text{H}_2\text{O}$: A – dopasowanie funkcji Gaussa do danych eksperymentalnych; B – analiza widm zróżniczkowanych. Oryginalne zróżniczkowane widmo XES jest zbyt zaszumione. Pionowe przerywane linie pokazują zakres przerwy energetycznej.

otoczenia chemicznego (w obu związkach żelazo jest formalnie na III stopniu utlenienia). W szczególności, analiza widm HR-XAS pozwoliła na dokładniejsze określenie struktury pików przedkrawędziowych, który jest manifestacją przejść elektronowych ze stanu $1s$ żelaza na orbitale typu d leżące powyżej energii Fermiego [36]. Piki przedkrawędziowe dla $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ oraz $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \times 9 \text{H}_2\text{O}$ w widmach HR-XAS są przesunięte w stronę wyższych energii o kolejno 1,0(8) eV i 1,7(8) eV względem pierwszego lokalnego maksimum w widmie XAS Fe^0 , co w granicy niepewności można uznać za takie samo przesunięcie.

Aby wyznaczyć szerokość przerwy energetycznej ΔE_g pomiędzy pasmami przewodnictwa i walencyjnym, należy zbadać strukturę ostatnich stanów walencyjnych związku chemicznego i pierwszych stanów niezwiązanych powyżej energii Fermiego. Oznacza to konieczność porównania struktury pików $K\beta_{2,5}$ z widmami XES oraz pików odpowiadających za przejścia elektronowe $1s \rightarrow 3d$ w widmach XAS. W przyjętej konwencji za granicę stanu w widmie przyjmuje się ekstrema I-szej pochodnej

widma [10]. Położenie punktów przegięcia w widmie na podstawie I pochodnej wyznaczano poprzez dopasowywania funkcji Gaussa do fragmentów pochodnej. Jednakże w przypadku widma dla $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \times 9 \text{H}_2\text{O}$, ze względu na bardzo zły stosunek sygnału do szumu w rejonie walencyjnym widm XES, zwyczajne różniczkowanie widma prowadziło do bardzo zaszumionego i nieczytelnego wyniku. Aby rozwiązać problem nieczytelnej I pochodnej widma $\text{K}\beta$ XES $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \times 9 \text{H}_2\text{O}$ do piku $\text{K}\beta_{2,5}$ została dopasowana funkcja Gaussa, co jest pokazane na Rys. V. 7 A. Dalsza analiza była prowadzona przy użyciu I pochodnej dopasowanej funkcji Gaussa pokazanej na Rys. V. 7 B. Ostatecznie na podstawie policzonych pochodnych i dopasowań, wyznaczono wartości przerw energetycznych dla trzech zmierzonych związków Fe^0 , $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ oraz $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \times 9 \text{H}_2\text{O}$ równe kolejno: 1,1(7) eV, 2,1(8) eV i 3,6(1,1) eV. Dla hematytu wyniki te są zgodne z wartościami otrzymanymi w eksperymencie XPS (ang. *X-Ray Photoemission Spectroscopy*, Spektroskopia fotoelektronów w zakresie promieniowania X) [79,88]. Jednocześnie należy zaznaczyć, że wyniki otrzymane tą metodą nigdy nie będą w pełni zgodne z wartościami wyznaczonymi metodami optycznymi, ze względu na efekty oddziaływania z dziurą rdzeniową [89].

Lepsze zrozumienie struktury i zmian przerwy energetycznej można uzyskać porównując widma eksperymentalne do obliczeń *ab-initio*. W rozdziale II pokazano, że widmo XES opowiada stanom elektronowym obsadzonym, a widmo XAS elektronowym stanom nieobsadzonym badanego pierwiastka. Wykonując pomiary przy krawędzi absorpcji K (7112 eV dla Fe), dostaje się głównie informację o przejściach typu $1s \rightarrow 2p$ oraz z mniejszym prawdopodobieństwem o przejściach typu $1s \rightarrow 3p$ oraz $1s \rightarrow 3d$. Uwzględniając prawdopodobieństwa przejść, za pomocą obliczeń teoretycznych można w wiarygodny sposób odtworzyć strukturę stanów elektronowych. W programie FEFF 9.6 [55] wykonano obliczenia widm emisyjnych zbadanych związków w zakresie linii $\text{K}\beta_{1,3}$ do obszaru walencyjnego oraz widm XANES w zakresie od -25 do 80 eV wokół krawędzi K absorpcji żelaza. Dodatkowo we wszystkich obliczeniach wyznaczono gęstości stanów elektronowych (DOS). Struktury do obliczeń w przypadku folii żelaznej i hematytu uzyskano z bazy internetowej WebATOMS [90], podczas gdy strukturę azotanu (VI) żelaza (III) uzyskano z literatury [91]. Obliczenia wykonano przy użyciu algorytmu pełnego wielokrotnego rozpraszania (FMS) poprzedzonego procedurą pola samouzbieżnionego (SCF) dla potencjałów atomowych przybliżonych modelem studzienkowym. Wakancja rdzeniowa była modelowana za pomocą modelu oddziaływania opartego na stanie końcowym (ang. *Final State Rule*, FSR) [92,93]. Jako potencjał korelacyjno-wymienny, wybrano Częściowo Zdelokalizowany potencjał (ang. *Partially Nonlocal*). Algorytmy SCF i FMS operowały w promieniu 9,0 Å i 8,0 Å, 11,0 Å



Rysunek V. 8 Poszczególne etapy wyznaczenia stanów obsadzonych i nieobsadzonych (A-B) oraz zastosowana odwrotna korekta samoabsorpcji (C): A – funkcje DOS zestawione z funkcjami arcus tangens dla stanów obsadzonych i nieobsadzonych; B – funkcje DOS po rozdzieleniu na część obsadzoną i nieobsadzoną zestawione z funkcjami arcus tangens dla stanów obsadzonych i nieobsadzonych C – efekt działania korekty samoabsorpcji na widmo XAS żelaza.

i 10,0 Å oraz 8,0 Å i 7,0 Å dla kolejno Fe⁰, α-Fe₂O₃ oraz Fe(NO₃)₃ x 9 H₂O. Na tym etapie należy zaznaczyć trzy ograniczenia tych obliczeń. Pakiet FEFF nie uwzględnia w swoich obliczeniach efektu samoabsorpcji, zamiast tego jako wynik podając „idealne”, niezaburzone widma. Po drugie, widma otrzymywane w wyniku końcowym są często znacznie przesunięte w skali energii względem tych eksperymentalnych. Wynika to z faktu, iż jednym z przybliżeń zastosowanych w programie jest przybliżenie pola średniego dla elektronów, które może skutkować niepoprawnymi wynikami w obszarze przykrawędziowym widm. Trzecim ograniczeniem zastosowanych obliczeń gęstości stanów elektronowych jest fakt, iż nie są one różnicowane na stany obsadzone i nieobsadzone. Wszystkie te ograniczenia można jednak skorygować w toku analizy wyników obliczeń jak to zostało pokazane na Rys. V. 8.

Najpierw należy dokonać korekty położenia widma, która polega na porównaniu położenia widm: teoretycznego, eksperymentalnego i przesunięciu tego pierwszego, natomiast podział funkcji DOS na stany obsadzone i nieobsadzone wymaga dokładniejszego omówienia.

Program FEFF obliczając funkcje DOS podaje je w energetycznej skali względnej $E - E_f$ [eV], względem poziomu energetycznego Fermiego. Ta sama skala jest również dostępna dla obliczonych widm, co jest przydatne przy porównywaniu obliczeń do eksperymentu. W celu oddzielenia wkładu od stanów nieobsadzonych do całkowitych funkcji gęstości stanów, funkcje DOS zostały wymnożone przez tak zwaną funkcję skokową $Q(E)$ [93]:

$$Q(E) = 0,5 + \frac{1}{\pi} \arctan\left(\frac{E-E_f}{0,5\cdot\Gamma_{1s}}\right) \quad (V.1)$$

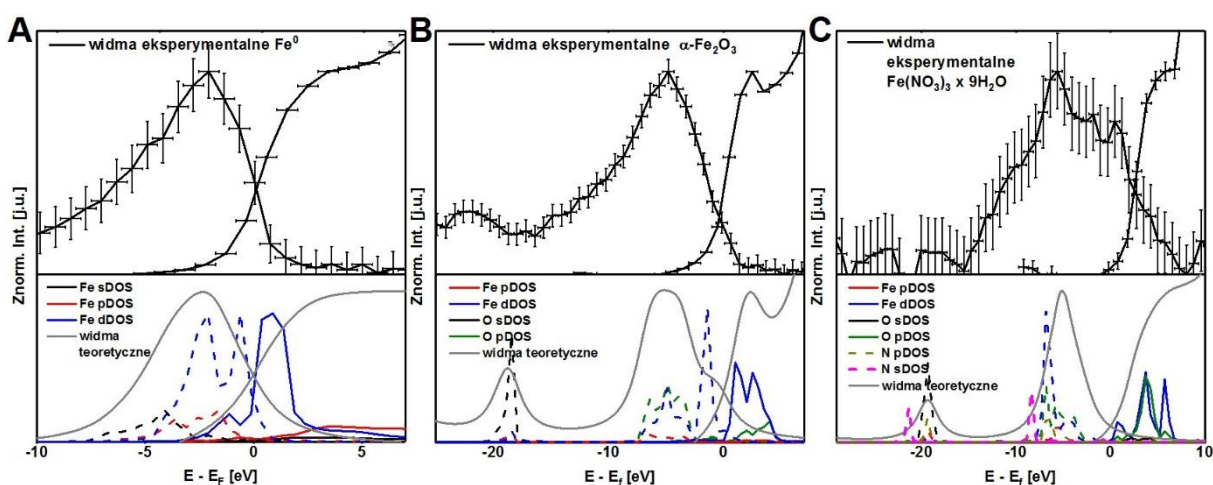
gdzie: E_f – energia Fermiego jest parametrem;

Γ_{1s} – szerokość energetyczna stanu dziury rdzeniowej na poziomie 1 s żelaza równy 1,19 eV [93];

Analogicznie wykonano mnożenie funkcji DOS przez odbicie lustrzane funkcji opisanej wzorem (V.1), aby otrzymać wkład pochodzący od stanów obsadzonych. Obie funkcje: $Q(E)$ i $Q(-E)$ wraz z funkcjami DOS przedstawiono na Rys. V. 8 A przed korektą i na Rys. V. 8 B po korekcie. Jak można zauważyć, granica obu zakresów funkcji DOS znajduje się w pobliżu wartości $E = E_f$ przeskalowanej do 0.

Należy jeszcze rozważyć efekt samoabsorpcji. W przeprowadzonym eksperymencie, badane były próbki stałe, nierozcieńczone o grubości ok. 2 mm. Zgodnie z dyskusją przeprowadzoną w Rozdziale II oznacza to, iż należy spodziewać się bardzo silnego efektu samoabsorpcji. W celu dodania tego efektu do widm otrzymanych *ab-initio* wykorzystano program służący do dodania zjawiska samoabsorpcji, opisany w Rozdziale III i zastosowano go do widm teoretycznych XAS obliczonych w programie FEFF. Przykładowy rezultat działania programu jest pokazany na Rys. V. 8 C. Taka procedura pozwala punkt po punkcie zmodyfikować teoretyczne widmo XAS tak, aby w rezultacie otrzymać widmo obciążone efektem samoabsorpcji. W przeciwieństwie do dotychczasowego podejścia do problemu samoabsorpcji, tutaj wykorzystując wiedzę na temat próbki można wykonać modyfikację widma otrzymanego metodą *ab-initio*, która upodabnia widma teoretyczne i eksperymentalne, jednocześnie nie modyfikując danych doświadczalnych. Zaproponowane rozwiązanie jest jednak bardziej pracochłonne niż dotychczasowe podejście, dlatego aby usprawnić proces, napisany został kod w języku C++ umożliwiający wykonanie korekty znormalizowanego widma. Kod został załączony na końcu Rozprawy w sekcji Załączniki. W celu uzyskania informacji na temat struktury przerwy energetycznej badanych związków porównano widma eksperymentalne dla wszystkich badanych próbek z widmami teoretycznymi po modyfikacji wraz z funkcjami DOS podzielonymi na stany obsadzone i nieobsadzone. Rezultat pokazany jest na Rys. V. 9 A-C. W zależności od zmiany własności przewodzących próbek, stany

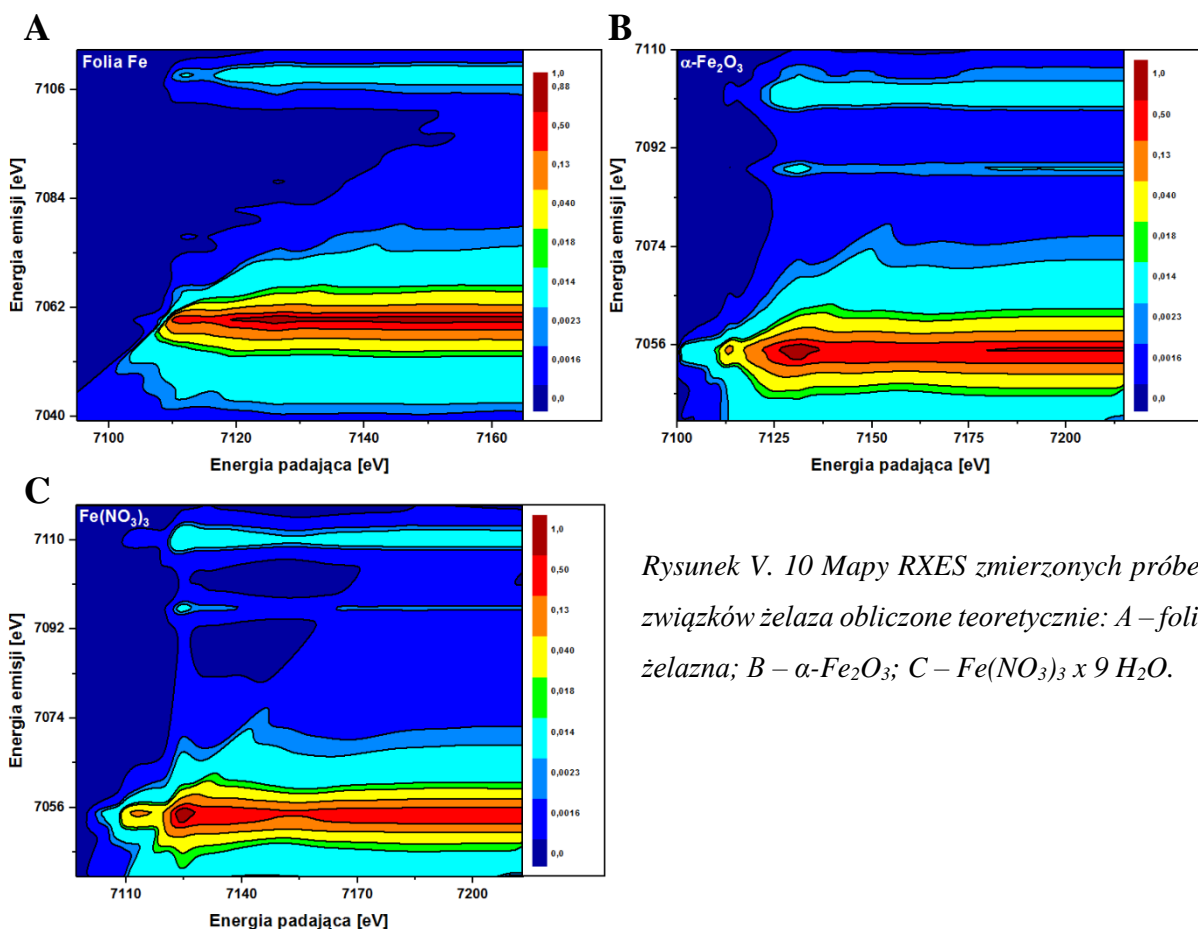
walencyjne i nieobsadzone odsuwają się od siebie. Ponadto, każdy związek ma inną strukturę elektronową, która wpływa na przerwę energetyczną. Dla każdego związku, w funkcjach DOS wyróżnia się wspólny podwójny pik przy energiach od -3 eV do 4 eV, od 0 eV do 7 eV oraz od 2 eV do 7 eV względem E_F dla kolejno Fe^0 , $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ i $Fe(\text{NO}_3)_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$, reprezentujący nieobsadzone orbitale typu d. Kształt piku odzwierciedla właściwości fizyczne materiału: w przypadku Fe^0 , elektrony walencyjne są wstrzykiwane z pasma przewodnictwa do pasma przewodnictwa i zdelokalizowanej chmury elektronów charakterystycznej dla metalu, stąd wokół atomów jest ich mniej. W $Fe(\text{NO}_3)_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$ tworzą się silne wiązania spolaryzowane, a grupy NO_3^- są donorami elektronów, przez co efektywnie więcej elektronów jest na powłoce walencyjnej Fe. Z kolei w $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ sytuacja jest pośrednia: tworzą się silne wiązania z donorami elektronów jednakże polaryzacja wiązania jest dużo mniejsza. W zależności od związku chemicznego zmienia się również kształt przerwy energetycznej. W przypadku Fe^0 stany obsadzone i nieobsadzone nachodzą na siebie, a ponadto składają się głównie z orbitali typu d, z niewielką domieszką orbitali typu s i p. Z kolei w hematycie, stany są bardziej rozsunięte, jednakże ciągle graniczą ze sobą, a główny wkład do struktur granicznych wokół przerwy energetycznej mają mieszane orbitale powstające w wyniku hybrydyzacji stanów typu p tlenu i d żelaza. W przeciwieństwie do pozostałych dwóch związków, stany elektronowe obsadzone i nieobsadzone azotanu są całkowicie rozdzielone. Pasma przewodnictwa $Fe(\text{NO}_3)_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$ składa się z stanów nieobsadzonych typu d żelaza i typu p tlenu, podobnie jak w hematycie. Dodatkowo, w przypadku $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ i $Fe(\text{NO}_3)_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$ w odległości około -20 eV od E_F , obecna jest struktura – pik $K\beta$ '' składająca się z orbitali typu s tlenu oraz w przypadku azotanu również domieszki orbitali typu s azotu. Jest to widoczny wpływ atomów II strefy koordynacyjnej:



Rysunek V. 9 Wyniki eksperymentu obrazujące przerwę energetyczną: widma eksperymentalne oraz teoretyczne wraz z funkcjami DOS policzonymi w pakiecie FEFF i odtwarzającymi eksperyment dla: A – folii żelaznej; B – $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$; C – $Fe(\text{NO}_3)_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$.

w azotanie atomy azotu są związane z żelazem poprzez atomy tlenu. Należy zaznaczyć, iż w rejonie piku $K\beta''$ azotanu (Rys. V. 9 C) statystyka pomiaru nie pozwala jednoznacznie stwierdzić obecności tego elementu widma. Położenie poszczególnych pików w widmie XES można porównać z danymi XPS dla $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Według nich, w odległości -23 eV od E_F znajdują się stany $2s$ tlenu, natomiast w odległości -7 eV od E_f znajdują się stany $3p$ tlenu, które hybrydują ze stanami $3d$ żelaza [94]. Z kolei na podstawie widma XES, różnica energii między stanami rdzeniowymi O $2s$ i walencyjnymi O $3p$ wynosi 16 eV , co jest zgodne z wynikami obliczeń w programie FEFF. Na koniec, wyznaczone różnice w położeniach pików $K\beta''$ i $K\beta_{2,5}$ pomiędzy widmami $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ i $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$ wyniosły kolejno $3.4(6)\text{ eV}$ i $1.7(2.3)\text{ eV}$ co sugeruje obecność innego typu wiązania chemicznego pomiędzy tymi związkami oraz wskazuje na udział orbitali N $2s$ w strukturze $K\beta''$ $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$. Trzeba jeszcze zwrócić uwagę na fakt, iż widma eksperymentalne są znacznie bardziej poszerzone, niż teoretyczne oraz, że przesunięcie widm teoretycznych względem wyników eksperymentu jest w większych odległościach od E_F (ok. 20 eV). Większe poszerzenie jest efektem zwiększenia statystyki pomiaru. Aby to osiągnąć, analiza była dokonywana na większym wycinku mapy RXES, a widma poszerzone są dodatkowo o zdolność rozdzielczą eksperymentu ($1,5(5)\text{ eV}$). Niezgodność w położeniu piku $K\beta''$ pomiędzy wynikiem eksperymentalnym i teoretycznym, obliczonym w pakiecie FEFF, którą widać np. na Rys. V. 9 B, wynika z ograniczeń zastosowanego formalizmu FMS. Obliczenia oparte o pełne wielokrotne rozpraszanie są poprawne tylko w rejonie krawędzi absorpcji do około 30 eV , natomiast w miarę oddalania się od niej niepewność wyniku obliczeń gwałtownie rośnie [28]. Mając to na uwadze należy pamiętać, iż obliczenia oparte o formalizm FMS prowadzone w dużej odległości energetycznej od krawędzi absorpcji pozwalają jedynie na jakościową analizę wyników.

Mapy RXES pokazane na Rys. V. 5 można również odtworzyć teoretycznie za pomocą równań opisanych w Rozdziale III i równania (III.15). W tym celu wykorzystano program FEFF oraz program napisany w środowisku Mathematica 11. Na podstawie widm *ab-initio* XAS i XES Fe^0 , $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ i $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$ otrzymanych w programie FEFF wyliczono mapy RXES dla tych związków. Wynik został pokazany na Rys. V. 10 a-c. W celu redukcji czasu obliczeń, ograniczono obszary energii padającej i emisji do najbardziej charakterystycznych regionów. Porównując Rysunki V. 5 oraz V. 10 widać, iż w obliczeniach teoretycznych nie ma piku elastycznego. Jego powstawanie nie wynika z teorii opisanej przez program FEFF i jest efektem dodatkowym zachodzącym z powodu innego, nieuwzględnionego w obliczeniach zjawiska fizycznego. Poza tym wszystkie elementy widoczne na mapach eksperymentalnych (Rys. V. 5) zostały odtworzone w trakcie obliczeń. Na przykład, w trakcie eksperymentu



Rysunek V. 10 Mapy RXES zmierzonych próbek związków żelaza obliczone teoretycznie: A – folia żelazna; B – $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$; C – $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \times 9 \text{H}_2\text{O}$.

przejścia walencyjne w $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$ zostały zarejestrowane z bardzo złą statystyką, co szczególnie widać na Rys. V. 9 c. W takim przypadku obliczenia *ab-initio* pozwoliły na potwierdzenie obecności przejścia $\text{K}\beta''$ w odległości -20 eV od krawędzi absorpcji. Należy jednak pamiętać, iż wyznaczono mapy RXES w oparciu o obliczenia *ab-initio* w programie FEFF. Jak już to opisano wcześniej, metoda FMS jest obarczona kilkoma ograniczeniami, w szczególności jeśli chodzi o wyznaczenie położenia poziomu Fermiego E_F . Oznacza to, że otrzymane mapy RXES powinno się traktować jakościowo.

V. 4 Podsumowanie

W ramach eksperymentu, wykonano pomiary RXES trzech związków żelaza o różnych własnościach przewodzenia prądu elektrycznego: Fe^0 , $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ i $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$. Celem doświadczenia, było zbadanie różnic w strukturze przerwy energetycznej wymienionych związków chemicznych i skorelowanie funkcji gęstości stanów elektronowych z poszczególnymi elementami widm rentgenowskich. Zademonstrowano możliwości metody RXES jako narzędzia, które uzupełnione obliczeniami teoretycznymi, pozwala wyznaczyć kompletną strukturę elektronową prostych związków chemicznych o uporządkowanej strukturze krystalicznej. W szczególności w trakcie eksperymentu:

- Przy pomocy pomiarów map $K\beta$ RXES otrzymano informację zarówno o stanach obsadzonych, jak i nieobsadzonych Fe w badanych związkach;
- Opracowano metodologię analizy map RXES oraz zidentyfikowano ograniczenia techniki pomiarowej, w szczególności obecność efektu samoabsorpcji, długiego czasu pomiaru oraz niskiej statystyki pomiaru w rejonie v_2c XES;
- Przy pomocy obliczeń *ab-initio* w programie FEFF, w widmach XES zidentyfikowano piki $K\beta_{1,3}$, $K\beta'$, $K\beta_{2,5}$ oraz $K\beta''$ oraz w widmach absorpcyjnych przejścia elektronowe $1s \rightarrow 3d$ i $1s \rightarrow 4p$ dla żelaza w badanych związkach;
- Opracowano model pozwalający na dodanie efektu samoabsorpcji do widm *ab-initio*;
- W wyniku obliczeń funkcji DOS, stwierdzono, że struktura przerwy energetycznej w badanych związkach zawiera intensywny, podwójny pik w funkcji gęstości stanów nieobsadzonych typu d żelaza. W zależności od związku chemicznego, w jakim znajdował się metal, pik zmieniał swój kształt. Jest to charakterystyczna struktura funkcji gęstości stanów dla wszystkich metali typu d, oprócz metali szlachetnych gdyż ich powłoka walencyjna jest w pełni zapełniona [95–97].;
- Wyznaczono przerwy energetyczne w trzech zmierzonych związkach: Fe^0 , $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ oraz $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$ wynoszące kolejno: 1.1(7) eV, 2.1(8) eV i 3.6(1.1) eV;
- W oparciu o równanie Kramersa-Heisenberga i wyniki obliczeń w programie FEFF, obliczono teoretyczne mapy RXES dla Fe^0 , $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ oraz $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$ z dobrą zgodnością z eksperymentem;
- Wykazano, że technika RXES może być wykorzystywana z powodzeniem w pomiarach próbek krystalicznych związków nieorganicznych metali grupy d;

VI. Badanie kompleksów białka prionowego z jonami Cu(II) metodą XANES

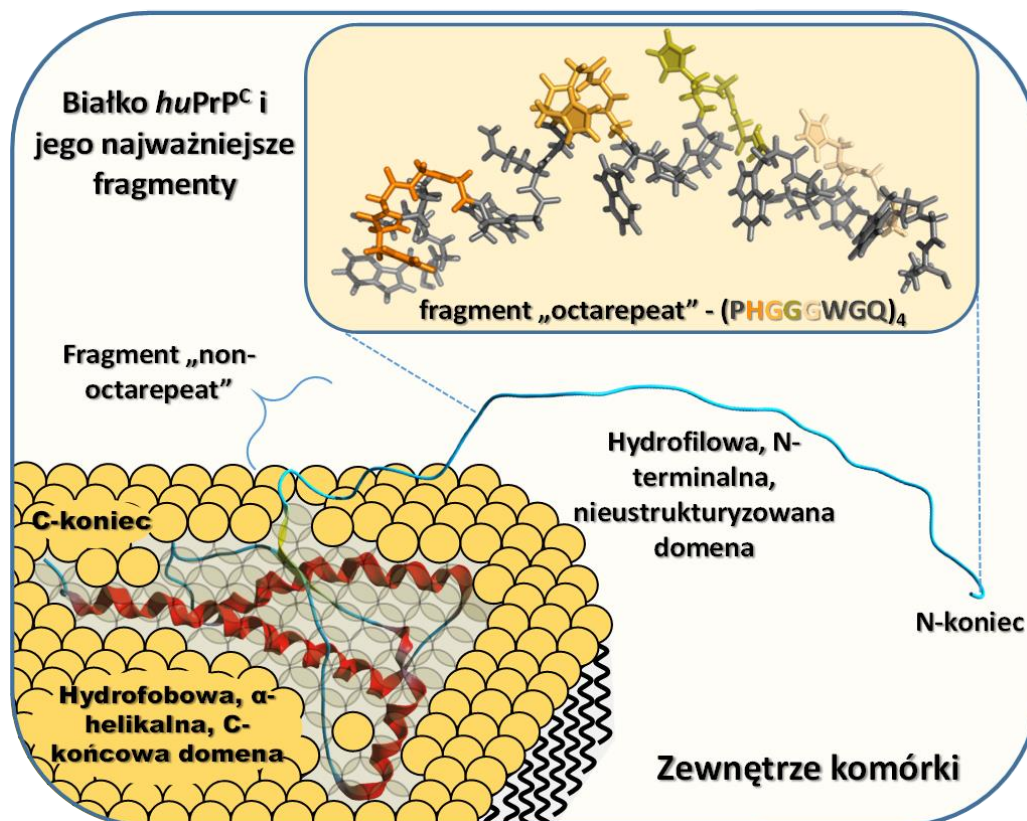
VI. 1 Wstęp

A. Choroby neurodegeneracyjne

Obecnie choroby neurodegeneracyjne są uznawane za problem cywilizacyjny. Zaliczają się do nich takie jednostki chorobowe jak choroba Alzheimera i Parkinsona, które według danych epidemiologicznych są jednymi z najczęściej występujących zaburzeń [98]. Innymi chorobami neurodegeneracyjnymi, tak zwanymi pasażowalnymi encefalopatiami gąbczastymi (ang. *Transmissible spongiform encephalopathies, TSE*) albo chorobami prionowymi są dolegliwości przenoszone przez wirulentny czynnik białkowy, prion. Według danych epidemiologicznych, najczęściej występującymi chorobami prionowymi u ludzi są Choroba Creutzfeldta-Jakoba, Zespół Gerstmann-Sträusslera-Scheinkera oraz choroba Kuru [99]. Różnica pomiędzy chorobami Alzheimera i Parkinsona a chorobami prionowymi polega na tym, że te drugie mogą być przenoszone przez priony. Wspólny mianownik wszystkich chorób neurodegeneracyjnych to podobny zespół objawów: stopniowy zanik zdolności kognitywnych i postępujące zaburzenia układu ruchowego oraz mięśniowo-szkieletowego. Wynikają one ze stopniowej akumulacji białek w postaci nierozpuszczalnych agregatów w Centralnym Układzie Nerwowym, prowadzącej do śmierci komórek nerwowych. Dotychczas zidentyfikowano ponad 90 białek, które mają możliwość nieprawidłowego fałdowania prowadząc do chorób neurodegeneracyjnych [100,101].

B. Białko PrP^C

W przypadku chorób prionowych, jednym z kluczowych białek jest ludzkie białko prionowe huPrP^C (ang. *human Protease Resistant Protein*) o strukturze pokazanej na Rys. VI. 1. Jest to białko błonowe, które w natywnej formie jest zbudowane z 209 aminokwasów ułożonych w dwie domeny strukturalne [103,104]. Pierwsza, C-końcowa domena ma formę globularną, jest hydrofobową strukturą zbudowaną głównie z α -helis i zakotwicza białko w błonie. Nieustrukturyzowana N-terminalna domena białkowa znajduje się poza błoną komórkową i jest skierowana ku zewnątrz komórki. W tej domenie znajdują się cztery



Rysunek VI. 1 Struktura białka prionowego, jego zakotwiczenie w błonie komórkowej oraz szczegółowa budowa fragmentu „octarepeat” (insert). Główną strukturę zaczerpnięto z pliku 2lmt.pdb, a strukturę domeny z pliku 2kkg.pdb z bazy RCSB PDB. Rysunek przetłumaczony z [102].

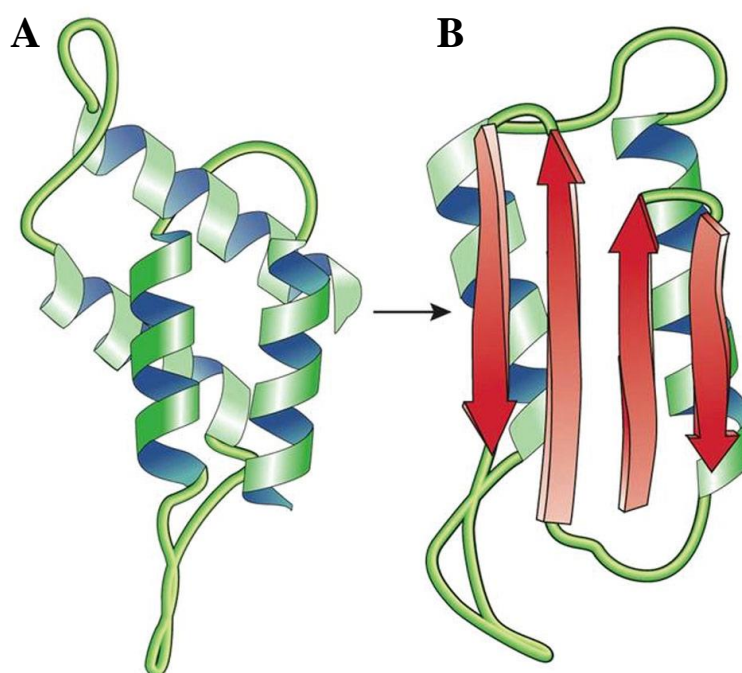
tandemowo ułożone sekwencje ośmiu aminokwasów PHGGGWGQ³ zwanych regionami „octarepeat” [105–108] (ang. *octa* – osiem, *repeat* – powtórzenie). Dodatkowo, pomiędzy domenami występuje krótki fragment nazwany fragmentem „non-octarepeat”. Oba te fragmenty mają bardzo silne powinowactwo do jonów Cu(II) i Zn(II) [109,110] oraz nieco mniejsze do innych dwuwartościowych jonów metali [105].

Białko PrP^C ma możliwość spontanicznej transformacji z izoformy PrP^C do patologicznej, źle sfałdowanej izoformy *scrapie*, PrP^{Sc} [111–117]. Jest to proces leżący u podstawy chorób prionowych. Postępująca agregacja błędnie sfałdowanych białek PrP^{Sc} powoduje śmierć komórek nerwowych, co w efekcie upośledza zdolności ruchowe i kognitywne pacjenta [101]. W przeciwieństwie do PrP^C, forma *scrapie* jest niezwykle stabilna i odporna na enzymy proteolityczne oraz czynniki środowiskowe. Wynika to z faktu, iż w tej formie strukturalnej w obu domenach dominują β-kartki tworzące bardzo stabilny układ [118,119] pokazany na Rys. VI. 2, który dodatkowo jest w dużej części hydrofobowy,

³ Każda litera oznacza jeden aminokwas: P – prolina; H – histydyna; G – Glicyna; W – tryptofan; Q – Glutamina

co sprzyja agregacji. PrP^{Sc} jest również wirulentne, może rekrutować inne białka PrP^C i zmieniać ich konformację.

Białko PrP^C występuje głównie w przestrzeni presynaptycznej, w której również występują największe w organizmie stężenia jonów Cu(II) i reguluje ich stężenie [105,120,121]. Jednakże rola tego białka nie jest ograniczona jedynie do regulacji, bowiem udowodniono, iż posiada ono również funkcje receptorowe dla białka amyloidu- β , które jest głównym czynnikiem białkowym w chorobie Alzheimera [122,123]. Wykazano również, iż nadmierna ekspresja genu PRNP kodującego białko PrP^C u myszy chroni przed zaburzeniami w zdolnościach poznawczych wywoływanych przez rozwój choroby Alzheimera [123–125]. Jednocześnie, zwierzęta nie posiadające genu PRNP, cierpiały na dużo większe uszkodzenia w wyniku działania wolnych rodników, gdyż aktywność enzymu dysmutazy nadadtlenkowej była znacznie obniżona [126]. Powiązano to z faktem, iż białko PrP^C może wiązać jony Cu(II) i w rzeczywistości działać jak dysmutaza nadadtlenkowa [127]. Z drugiej strony usunięcie fragmentów PHGGGWGQ z białka spowodowało znaczne spowolnienie postępów choroby. Jednym z niedawno odkrytych mechanizmów ochronnych wiązania Cu(II) do rejonu „non-octarepeat” jest blokowanie przez jon Cu(II) działania enzymów α -proteinaz na granicy domen [128]. Z drugiej strony, niezależne badania dowiodły, iż wiązanie jonów miedzi przez białko PrP^C może prowadzić do rozwoju chorób neurodegeneracyjnych [116] poprzez ustrukturyzowanie N-terminalnej domeny [114].

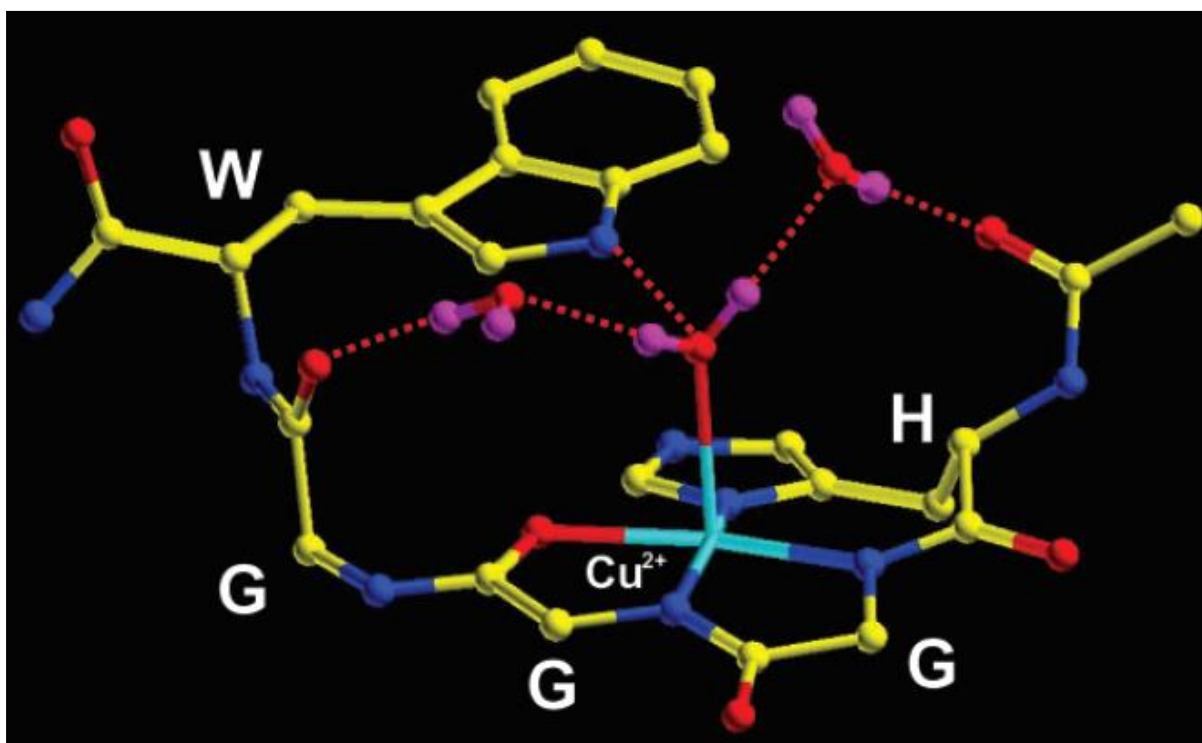


Rysunek VI. 2 Schemat konwersji białka prionowego z α -helikalnej izoformy a) PrP^C do izoformy b) PrP^{Sc} bogatej w β -kartki. Rysunek pobrano z artykułu [129]. Copyright © 2018 CSEG.

C. Struktura kompleksów PrP^C-Cu(II)

Rozważając strukturę kompleksu PrP^C z metalem można się ograniczyć do domeny N-terminalnej, gdyż to w niej znajdują się miejsca wiążące metale. Istnieją potencjalne miejsca wiążące Cu(II) w domenie globularnej białka, jednakże udowodniono, iż nie wiążą one jonów Cu(II) jeżeli białko ma izoformę PrP^C [119]. Tym samym, w białku PrP^C aktywnych pozostaje pięć miejsc wiążących: cztery w rejonie „octarepeat” i jedno w rejonie ”non-octarepeat” [105,119].

Ilość koordynowanych jonów metalu przez białko silnie zależy od pH i całkowitego stężenia jonów metalu w roztworze [129]. Każda z sekwencji PHGGGWGQ w warunkach fizjologicznych, oraz przy odpowiednio wysokim stężeniu jonów może przyłączyć jeden jon Cu(II) lub Zn(II). Struktura miejsca wiążącego miedź była badana na przestrzeni ostatnich dwudziestu lat. Wykorzystując między innymi połączone metody Krystalografii Rentgenowskiej oraz Elektronowego Rezonansu Paramagnetycznego (ang. *Electron Paramagnetic Resonance*, EPR) [108], obliczenia teoretyczne metodą Teorii Funkcjonału Gęstości, (ang. *Density Functiona Theory*, DFT) [130], zaproponowano pięcioczłonowe środowisko koordynacyjne jonu Cu(II). W tej geometrii, w pozycji ekwatorialnej jon Cu(II) jest koordynowany przez dwa atomy N pochodzące z glicyny, jeden atom N pochodzący z pierścienia imidazolowego histydy, oraz przez atom O z grupy CO. Dodatkowo, w pozycji



Rysunek VI. 3 Pierwsza struktura jonu Cu(II) związanego przez peptyd HGGW, będący subsekwencją PHGGGWGQ. Rysunek skopiowany za zgodą z [108]. Copyright © 2018, American Chemical Society.

aksjalnej znajduje się cząsteczka wody [108,129–133]. W ten sposób stabilizowany przez cząsteczkę wody jon Cu(II) jest efektywnie koordynowany przez dwa pięciocłonowe i jeden siedmiocłonowy pierścień helatujący. W przypadku dużej nadwyżki białka względem jonów, jon Cu(II) jest stabilizowany przez cztery pierścienie imidazolowe w pozycjach ekwatorialnych. Za pomocą metody XAS połączonej z EPR wykazano, że istnieje funkcyjna zależność między geometrią wiązania Cu(II) w białku prionowym, i stężeniem Cu(II) [106,114]. W szczególności, wyróżniono trzy ogólne sytuacje: 1) PrP^C jest znacznie więcej niż Cu(II); 2) PrP^C i Cu(II) są w stosunku około 1:1 oraz 3) PrP^C jest znacznie mniej niż Cu(II). Pierwsza sytuacja jest manifestowana tworzeniem się kompleksu, w którym jon Cu(II) jest koordynowany przez cztery grupy imidazolowe. Tego typu kompleksy Cu(II) były intensywnie badane metodami DFT, XAS oraz Jądrowego Rezonansu Magnetycznego [114,131,134]. Należy jednak dodać, że trzy atomy N pochodzące od pierścienia imidazolowego są potwierdzone i pewne, natomiast natura ligandu w czwartej pozycji ekwatorialnej jest dyskusyjna [134,135]. Druga sytuacja jest to opisany powyżej jon Cu(II) koordynowany przez dwa pięciocłonowe i siedmiocłonowy pierścień helatujący, jeden pierścień imidazolowy i cząsteczkę wody. Z kolei trzecia możliwość jest podobna do drugiej, jednakże zostaje zajętych więcej miejsc wiążących Cu(II) [106,114].

Drugim silnie wiązany do białka PrP^C jonem jest Zn(II). Powoduje to istnienie mechanizmów wzajemnej wymiany jonów Cu(II) i Zn(II) w funkcji ich stężenia i pH roztworu w kompleksach PrP^C-Zn(II) i PrP^C-Cu(II) [136,137]. Mimo niewielkich różnic między Zn(II) a Cu(II), ze względu na bardziej zamkniętą konfigurację elektronową Zn(II), jon ten może być koordynowany w mniej różnorodny sposób. W białku PrP^C dotychczas potwierdzono istnienie jednego modu wiążącego Zn(II) w postaci trzech atomów N pochodzących z pierścieni imidazolowych [131,133,134]. Jednocześnie kompleksy białka prionowego z cynkiem są stabilniejsze i dużo mniej podatne na czynniki środowiskowe niż z miedzią.

VI. 2 Opis eksperymentu

Głównym celem przeprowadzonej serii eksperymentów było zrozumienie molekularnych podstaw amyloidogenezy oraz zidentyfikowania, jaką rolę w tym procesie odgrywają jony metali dwuwartościowych. W przeprowadzonych badaniach głównym użytym modelem było ludzkie białko prionowe *huPrP^C* (23-231) (fragment sekwencji aminokwasów o numerach od 23 do 231). Celami szczegółowymi były:

- 1) Zbadanie makroskopowych własności monomeru *PrP^C* i ocena stopnia agregacji białka;
- 2) Opracowanie metodologii eksperymentalnej i analizy danych XAS dla metalobiałek, w szczególności tych opartych na *Cu(II)*;
- 3) Potwierdzenie stechiometrii wiązania *Cu(II)* w próbkach i opracowanie modelu kompleksu *PrP^C-Cu(II)*;
- 4) Zbadanie wpływu środowiska, w jakim znajdowało się białko na otrzymane wyniki;
- 5) Zrozumienie natury wytworzonych kompleksów *PrP^C-Cu(II)* na poziomie elektronowym i przełożenie tych wniosków na zachowanie białka;

Część eksperymentalna projektu była podzielona na dwa główne etapy, przy czym pierwszy, obejmujący przygotowanie próbek, nie jest przedmiotem niniejszej rozprawy.

A. Otrzymywanie białka *PrP^C* i tworzenie kompleksu *PrP^C-Cu(II)*

Do eksperymentu, zarówno czyste białko, jak i kompleks *PrP^C-Cu(II)* otrzymano w ramach realizacji projektu NCN OPUS nr. 2014/15/B/ ST4/04839. Białko było otrzymywane na drodze ekspresji plazmidu w bakterii BL21DE3 *E. Coli*, i systemu ekspresji genów bakteriofaga T7 [108,138]. Oczyszczanie następowało za pomocą chromatografii jonowymiennej w kolumnie CM-Sepharose przy zastosowaniu liniowego gradientu NaCl, 10 ml stężenia fosforanów i pH 6,4. Czystość końcowego produktu, potwierdzona elektroforetycznie i za pomocą spektrometrii mas, była wyższa niż 98 %. Kompleks *PrP^C-Cu(II)* w formie wodnego roztworu był otrzymywany przez powolne miareczkowanie roztworu białka w buforze cytrynianowym o pH 5,4 za pomocą *CuCl₂*.

B. Pomiary XAS kompleksów *PrP^C-Cu(II)*

W trakcie badań białka, wykonano dwa eksperymenty XAS. Poniżej znajduje się dokładny opis parametrów eksperymentów:

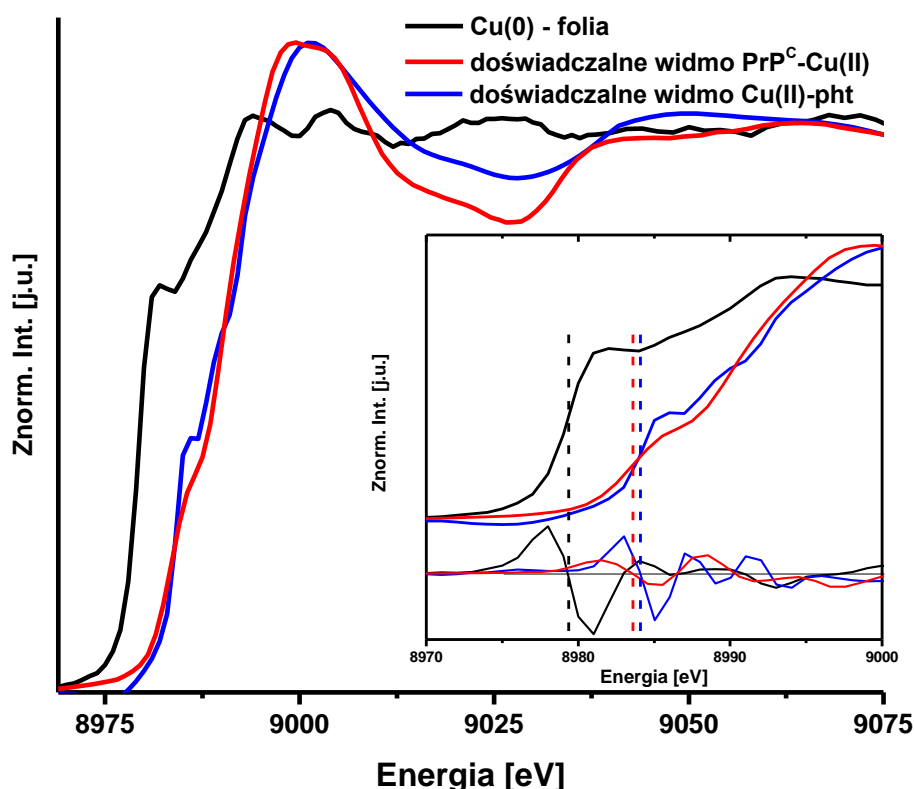
- 1) Pierwszy pilotażowy eksperyment wykonano na wiązce SuperXAS (10XDA) w Swiss Light Source w Paul Scherrer Institut, Szwajcaria. Pomiar był przeprowadzony w temperaturze pokojowej na liofilizowanym kompleksie PrP^C-Cu(II) (23-231) w rejonie krawędzi K miedzi. Eksperyment przeprowadzono w modzie fluorescencyjnym. Strumień fotonów wynosił około 10^{12} fotonów/s, a wiązka była skolimowana za pomocą dwóch lusterek wygiętego i toroidalnego pokrytego warstwami Rh i Pt. Dobór energii w zakresie 8950 – 9100 eV był zapewniony przez wykorzystanie krzemowego (111) podwójnego monochromatora. Akwizycję danych przeprowadzono za pomocą pięcioelementowego detektora promieniowania X firmy SGX SensorTech. Ze względu na ogólną wrażliwość metaloprotein na fotoredukcję w celu zredukowania efektu do minimum, pomiar każdego widma był dokonywany w innym punkcie próbki. Tego typu podejście jest sprawdzonym sposobem redukcji uszkodzeń radiacyjnych [139]. Jako referencję zmierzono widmo folii Cu.
- 2) Drugi eksperyment wykonano na wiązce SuperXAS w PSI, w warunkach takich samych jak pierwszy i przy pomocy takiego samego detektora. Jednakże tym razem badano próbki wodne o stężeniu 50 μM jonów miedzi: kompleksu PrP^C-Cu(II), buforu cytrynianowego Cu-Acc₂, Cu-pht (*Sigma-Aldrich*), CuSO₄ (*Sigma-Aldrich*), kompleksu Cu(II)-L-Histydyna (Cu(II)-L-His). Kompleks Cu(II)-L-His został przygotowany na drodze reakcji chemicznej według [140] przy użyciu L-Histydyny (*Sigma-Aldrich*) oraz CuSO₄ (*Sigma-Aldrich*) w stosunku ilościowym 2:1. Próbkę były mierzone w kapilarach kaptonowych (*GoodFellow*) o grubości ścianek 0,03 mm (± 20 %) i całkowitej średnicy 3 mm. Ze względu na podwyższone ryzyko fotoredukcji każde widmo było zbierane w innym miejscu kapilary leżącej poziomo, a całkowity czas pomiaru nie przekraczał 15 minut na punkt. Ze względu na niskie stężenie próbek i konieczność redukcji napromieniania próbek pomiar ograniczył się do części XANES widm rentgenowskich, a krok energetyczny widm wyniósł 1 eV. W efekcie zebrano dużą statystykę widm: 27 PrP^C-Cu(II), 20 Cu(II)-pht, 22 Cu(II)-L-His, 26 Cu(II)-Acc₂, 26 CuSO₄.

VI. 3 Analiza i wyniki

Poniżej zostaną przedstawione wyniki eksperymentów w takiej kolejności, w jakiej zostały opisane powyżej. Ponadto, ze względu na fakt, iż w trakcie analizy użyto kilku dodatkowych metod pomocniczych, będą one przybliżane Czytelnikowi w trakcie prezentowania wyników.

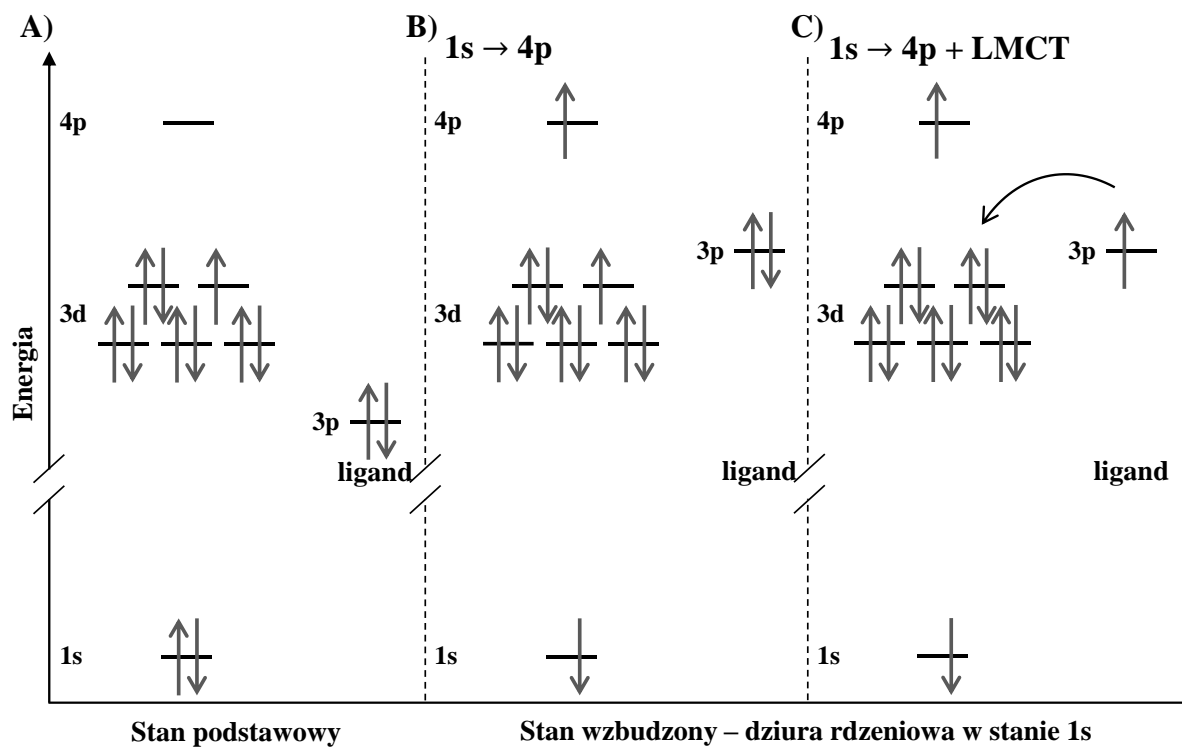
A. Pomiary XAS zliofilizowanego kompleksu $\text{PrP}^{\text{C}}\text{-Cu(II)}$ na wiązce SuperXAS w PSI – otrzymanie struktury kompleksu $\text{PrP}^{\text{C}}\text{-Cu(II)}$

Pierwsze wyniki, jakie zostały otrzymane w wyniku pomiarów próbek kompleksu białka $\text{PrP}^{\text{C}}\text{-Cu(II)}$ są to rezultaty eksperymentu przeprowadzonego na próbkach kompleksu białka po liofilizacji. W niezależnym eksperymencie wykazano brak agregacji białka w pierwotnym roztworze PrP^{C} , i po wytworzeniu kompleksu $\text{PrP}^{\text{C}}\text{-Cu(II)}$, oraz oszacowano rozmiar globularnej domeny białka na 4,4(7) nm [141]. Ze względu na trudności techniczne w trakcie pomiarów na wiązce SuperXAS otrzymano jedynie widma Cu(0) oraz kompleksu



Rysunek VI. 4 Widmo kompleksu $\text{PrP}^{\text{C}}\text{-Cu(II)}$ (23-231) porównane do widma kompleksu Cu(II) -ftalocyjanianu i folii miedzianej. Inset przedstawia zbliżenie na rejon krawędzi i przejścia $1s \rightarrow 4p$ oraz II pochodne. Przerywanymi liniami zaznaczono położenie krawędzi absorpcji według miejsc zerowych II pochodnych widm absorpcyjnych.

białkowego. Referencja Cu(0) posłużyła do kalibracji i znalezienia krawędzi K absorpcji Cu wynoszącej 8979 eV. W celu zmierzenia widm XAS dodatkowych związków referencyjnych wykonano pomiary uzupełniające na wiązce XAFCA [142] w Singapore Synchrotron Light Source, dzięki uprzejmości dr Agnieszki Banaś oraz dr Xi Shibo. Do porównania z widmem kompleksu białkowego wybrano kompleks Cu(II)-ftalocyjanianu. Jest to kompleks organiczny miedzi na II stopniu utleniania. Rezultat został pokazany na Rys. VI. 4. Ze względu na niskie stężenie Cu w próbce, otrzymane widmo PrP^C-Cu(II) charakteryzowało się dużym zaszumieniem i dlatego poddano go procedurze gładzenia wykorzystując filtr Szybkiej Transformaty Fouriera (ang. *Fast Fourier Transform*, FFT), z krokiem o rozmiarze 5 punktów. Wszystkie widma na Rys. VI. 4 zostały skalibrowane względem pierwszego punktu przegięcia w widmie Cu(0) (8979 eV) i znormalizowane względem pierwszego miejsca zerowego w ich II pochodnej. W wyniku porównania II pochodnych widm na Rys. VI. 4 otrzymano przesunięcie krawędzi absorpcji Cu o 4(1) eV w stronę wysokich energii dla PrP^C-Cu(II) i Cu(II)-ftalocyjanianu względem Cu(0). Tak znaczne przesunięcie krawędzi absorpcji oznacza duże różnice w sąsiedztwie atomowym oraz w gęstościach stanów Cu, które przekładają się na wyższy stopień utlenienia Cu w kompleksach organicznych. Oznacza to, iż jon Cu(II) nie uległ zjawisku fotoredukcji pod wpływem wiązki

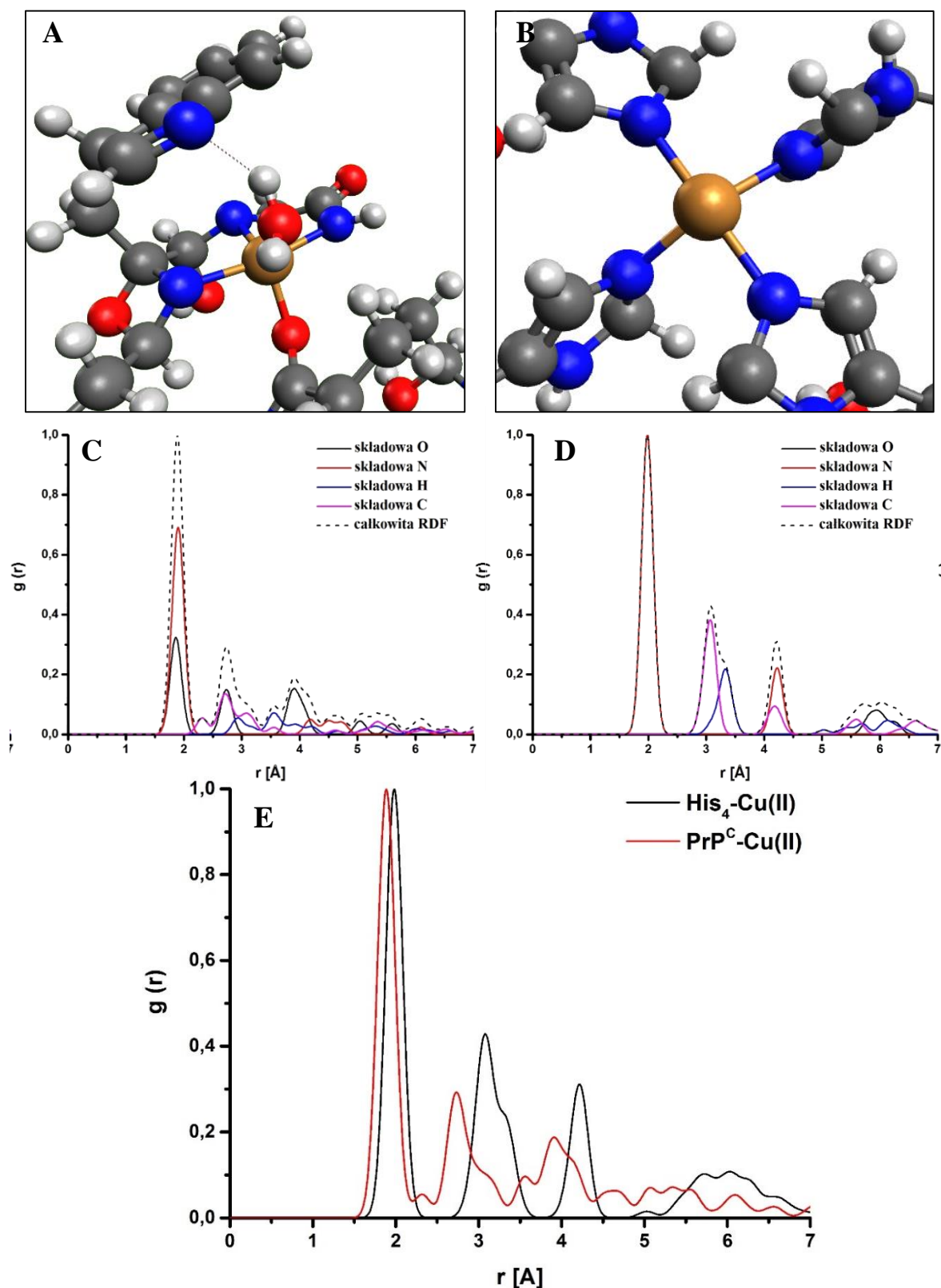


Rysunek VI. 5 Struktura stanów elektronowych w kompleksie Cu(II): A – bez transferu ładunku w stanie podstawowym; B – wzbudzenie jonu Cu(II) i powstanie wakancji w stanie 1s; C – transfer ładunku w wyniku relaksacji stanów 3d Cu(II).

promieniowania rentgenowskiego. Struktura obecna w widmach $\text{PrP}^{\text{C}}\text{-Cu(II)}$ i Cu(II) -ftalocyjanianu w rejonie 8984 eV jest charakterystyczną dla wieloelektornowego przejścia typu „shakedown” oznaczanego często jako $1s \rightarrow 4p + \text{LMCT}$ (ang. *Ligand to Metal Charge Transfer, LMCT*) [143]. Przy energiach 8995 eV – 9005 eV na Rys. VI. 4 widać przejścia tworzące główną część krawędzi absorpcji, zachodzące ze stanów 1s na stany 4p. Pik przedkrawędziowy, czyli przejścia $1s \rightarrow 3d$ jest niewidoczny ze względu na statystykę pomiaru. Przejścia powyżej białej linii zachodzą na wyższe stany nieobsadzone, a ponadto część struktur ma wkład od zjawiska EXAFS.

Widma XAS związków miedzi na +2 stopniu utleniania posiadają charakterystyczne przejścia $1s \rightarrow 4p + \text{LMCT}$, zwane przejściami „shakedown” [143]. Są one bezpośrednią konsekwencją transferu ładunku z orbitali ligandu na orbitale metalu. W momencie, gdy powstanie wakuacja w rdzeniu atomowym, a elektron rdzeniowy zostaje wzbudzony powyżej energii Fermiego, elektrony walencyjne zaczynają silniej odczuwać efektywny potencjał pochodzący od jądra atomowego [144,145]. W efekcie następuje niewielka relaksacja stanów walencyjnych i ich przesunięcie energetyczne. Jeżeli przesunięcie stanów walencyjnych metalu jest wystarczająco duże, mogą one znaleźć się niżej na skali energii niż stany walencyjne ligandów. Może to doprowadzić do transferu ładunku (elektronów) z ligandu na metal, gdyż będzie to korzystne energetycznie dla całego układu. Cały proces pokazany jest na Rys. VI. 5 A-C. Jest to słabo zbadany efekt, który występuje nie tylko w związkach Cu, ale również w związkach innych metali, w szczególności Cr oraz Zn. W metalu 3d z niezapelnioną całkowicie powłoką 3d, gdy w wyniku powstania dziury rdzeniowej w stanie M 1s (orbital 1s metalu) następuje przesunięcie na skali energii stanów walencyjnych M 3d poniżej orbitali L 2p (tutaj L = N i/lub O) [144,145]. W wyniku usunięcia elektronu ze stanu M 1s, stany M 3d odczuwają silniejszy efektywny potencjał kulombowski jądra atomowego i relaksują bardziej. Wówczas następuje zamiana miejsc na skali energii pomiędzy orbitalami M 3d i L 2p, co umożliwi transfer elektronów z L 2p na M 3d, zgodnie ze schematem pokazanym na Rys. VI. 5. Przejścia w rejonie of 8979 -8983 eV zostały zatem zidentyfikowane jako wieloelektronowe przejścia $1s \rightarrow 4p + \text{LMCT}$. Z kolei piki przedkrawędziowe pojawiają się, gdy dochodzi do elektronowych przejść kwadrupolowych, które są zwykle zabronione dipolowymi regułami wyboru. Jednakże dzięki zjawisku mieszania się orbitali M 3d i L 2p następuje zjawisko hybrydyzacji i powstają orbitale wypadkowe, co powoduje, że przejścia $1s \rightarrow 3d$ stają się dozwolone [144].

Wyniki eksperymentu zostały również zanalizowane teoretycznie metodą obliczeń *ab-initio*, przy użyciu programu FEFF 9.6, bardziej szczegółowo opisanego w Rozdziale II.



Rysunek VI. 6 Wyniki optymalizacji struktur zawierających Cu(II) pomocą pola siłowego UFF: A – kompleksu PrP^C-Cu(II) (23-106) i B – His₄-Cu(II) oraz funkcje RDF z uwzględnieniem wkładu poszczególnych pierwiastków dla: C - PrP^C-Cu(II) i D - B – His₄-Cu(II) oraz całkowite funkcje RDF dla obu modeli kompleksów Cu(II). Na rysunkach A-B, oznaczenia kolorów odpowiadają typom atomów: C – szary, N – niebieski, O – czerwony, H – biały, Cu – pomarańczowy.

Do obliczeń użyto struktury N-terminalnej domeny pochodzącej z ludzkiego prionowego PrP^C i składającej się z aminokwasów o numerach 23-106. Strukturę zaczerpnięto z bazy RSCB PDB z pliku o identyfikatorze 2KKG, a następnie ręcznie ją zmodyfikowano, zmieniając geometrię peptydu i tworząc miejsce wiążące oraz dodając jon Cu(II). Jako referencyjny kompleks organiczny wiążący Cu(II) zbudowano strukturę His₄-Cu(II). Do budowy cząsteczki His₄-Cu(II), modyfikacji peptydu PrP^C-Cu(II) (23-106) oraz optymalizacji otrzymanych struktur wykorzystano program Avogadro [146]. Geometrie kompleksów zostały zoptymalizowane przy pomocy pola siłowego UFF (ang. *Universal Force Field*) [147]. Aby upewnić się co do poprawności obliczeń oraz istnienia globalnego minimum energii potencjalnej, optymalizację geometrii powtarzano kilka razy, z każdą próbą zmieniając początkowe ułożenie atomów. Spośród otrzymanych wyników wybrano strukturę o najniższej energii. Wyniki optymalizacji pokazane są na Rys. VI. 6 A-B. Pole siłowe UFF było wykorzystywane w optymalizacji struktur związków organicznych [148], w obliczeniach widm NMR [149] oraz do rozwiązywania problemów dotyczących dokowania ligandów [150]. Jego zaletą jest parametryzacja oddziaływań między atomami, opierająca się jedynie na indywidualnych cechach pierwiastków w cząsteczce, hybrydyzacji i własnościach wiązań chemicznych. To podejście, dzięki licznym uproszczeniom, sprawdza się szczególnie dobrze przy testowaniu prostych modeli skomplikowanych cząsteczek. Zoptymalizowane struktury zostały następnie scharakteryzowane poprzez obliczenie dla nich Funkcji Rozkładu Radialnego (ang. *Radial Distribution Function, RDF*) $g(r)$ w programie I.S.A.A.C.S. [151]. Funkcja ta pozwala na wyznaczenie położenia atomów wokół absorbera (Cu) oraz na porównanie geometrycznych własności obu zoptymalizowanych struktur. Ponadto, wkłady pochodzące od konkretnych pierwiastków do całkowitej funkcji RDF mogły również zostać porównane. Obliczenia przeprowadzono w zakresie 0 -7 Å, a wyniki pokazane są na Rys. VI. 6 C-E. Jak można zauważyć w przypadku obu struktur, występuje podobne środowisko wokół atomów Cu oraz podobny podział na strefy koordynacyjne. Jednakże, co widać szczególnie na Rys. VI. 6 C-D, struktura kompleksu His₄-Cu(II) jest bardziej uporządkowana. Ponadto porównanie obu całkowitych funkcji $g(r)$ na Rys. VI. 6 E pokazuje, że kompleks PrP^C-Cu(II) (23-106) jest bardziej upakowany. Wreszcie, w wyniku optymalizacji, w kompleksie z peptydem została dodana cząsteczka H₂O, która wytworzyła wiązanie wodorowe z resztą tryptofanu poprzez atom N w pierścieniu imidazolowym. Z drugiej strony, ta sama cząsteczka wody koordynowała jon Cu(II) wytwarzając w ten sposób mostek stabilizujący całą strukturę [152].

Na podstawie otrzymanych struktur przeprowadzono obliczenia w programie FEFF 9.6 z wykorzystaniem metody pola samouzbieżnionego (SCF) i algorytmu FMS opisanego

w Rozdziale III. Przetestowano 78 kombinacji parametrów. Ostatecznie, jako potencjał korelacyjno-wymienny wybrano model Hedina-Lundqvista [153,154] z funkcją tła modelowaną potencjałem stanu podstawowego oraz oddziaływanie dziury rdzeniowej modelowane za pomocą reguły stanu końcowego (FSR). Wszystkie obliczenia prowadzono w promieniu 7 Å wokół atomu Cu. Jak już to opisano wcześniej, program FEFF oblicza widma teoretycznie nie obciążone efektem samoabsorpcji, jednakże eksperyment został przeprowadzony na próbce proszkowej, widma z której mogły być obciążone takim efektem. Jako wskazówka do dalszej analizy posłużył fakt, iż otrzymywane widma *ab-initio* mają znacznie większą intensywność w rejonie krawędzi absorpcji. Grubość próbki proszkowej została zmierzona i wyniosła 0,05 cm, co było wartością zdecydowanie wystarczającą, aby pojawił się efekt samoabsorpcji. Ponadto, skala efektu samoabsorpcji będzie zależeć od stechiometrii wiązania między PrP^C i Cu(II): im więcej jonów Cu(II) zostanie przyłączonych przez peptyd tym silniejszy będzie efekt widoczny w widmach rentgenowskich. Postanowiono uwzględnić ten fakt i oszacować stechiometrię wiązania Cu(II) przez N-terminalną domenę białka PrP^C w pH 6,5, dodając efekt samoabsorpcji do widm *ab-initio* XAS otrzymanych dla kolejnych stechiometrii wiązania jonów Cu(II) przez peptyd. W tym celu należało wyznaczyć gęstość próbki kompleksu w formie proszku. Ze względu na brak danych literaturowych i znaczną niestabilność badanego materiału, gęstość została wyznaczona teoretycznie. Wykorzystano tutaj empiryczny model objętości van der Waalsa zaproponowany przez Zhao et al. [155]:

$$V_{vdV} = \sum atomy - 5,92N_B - 14,70P_A - 3,80P_{NA} \quad (VI.1)$$

gdzie:

N_B – całkowita liczba wiązań w kompleksie;

P_A – całkowita liczba pierścieni aromatycznych w kompleksie;

P_{NA} – całkowita liczba pozostałych pierścieni w kompleksie;

Suma w wyrażeniu (VI.1) (wyrażenie $\sum atomy$) przebiega po indywidualnych objętościach van der Waalsa wszystkich atomów w środowisku organicznym według modelu zaproponowanego przez Bondi et al. [156]. Według tego modelu, objętość jonu miedzi wynosiła 1,43 Å³. Obliczenia przeprowadzono dla wszystkich możliwych stechiometrii, od 0 atomów Cu, do maksymalnej dopuszczanej literaturowo wartości 8 atomów Cu [157]. Jak już opisano, N-terminalna domena białka może specyficznie wiązać 6 atomów Cu, a ponadto istnieją dane sugerujące możliwość istnienia 2 dodatkowych miejsc wiążących znajdujących się w domenie α -helikalnej [158]. Obliczona gęstość próbki wyniosła 1,624 g/cm³.

Wykorzystując liniowe prawo Lamberta-Berra oraz definicję absorpcji można napisać równość:

$$\log_{10} \left(\frac{I}{I_0} \right) = \mu_f(E_f)cl \quad (\text{VI.2})$$

gdzie: I_0 – pierwotna intensywność fluorescencji rentgenowskiej wzbudzona w próbce;

I – fluorescencja rentgenowska po przejściu i przez próbkę i oddziaływaniu z jej atomami;

$\mu_f(E_f)$ – współczynnik absorpcji fluorescencji rentgenowskiej dla linii Cu $K\alpha_1$ o energii

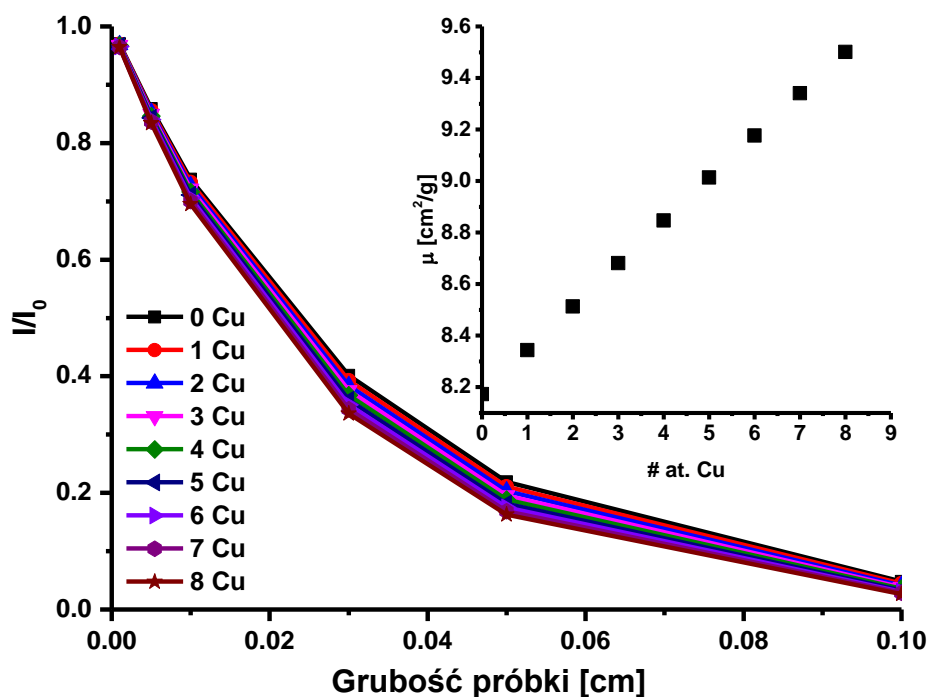
$$E_f = 8046,3 \text{ eV w jednostkach } \left[\text{cm}^2/\text{g} \right];$$

c – stężenie (tutaj równe gęstości) kompleksu PrP^C-Cu(II) (23-231) w $\left[\text{g}/\text{cm}^3 \right]$

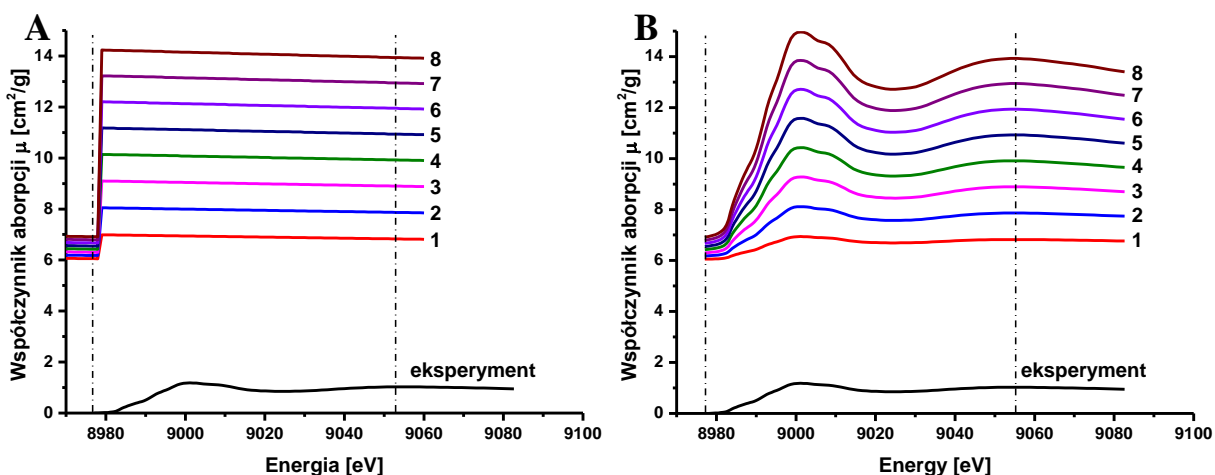
otrzymane z podzielenia jego objętości van der Waalsa przez masę kompleksu, obliczoną na podstawie struktury całego białka PrP^C z bazy RSCB PDB o identyfikatorze: 2LFT.pdb z uwzględnieniem jonów Cu(II);

l – grubość próbki w $[\text{cm}]$;

Korzystając z tablic przekrojów czynnych dla oddziaływania fotonów z materia, dostępnych na stronie National Institute of Standards and Technology (NIST) [67] wyznaczono współczynnik $\mu_f(E_f)$. Następnie obliczono całkowite osłabienie fluorescencji z uwzględnieniem efektu samoabsorpcji w funkcji grubości próbki, a różna stechiometria wiązania Cu(II) była

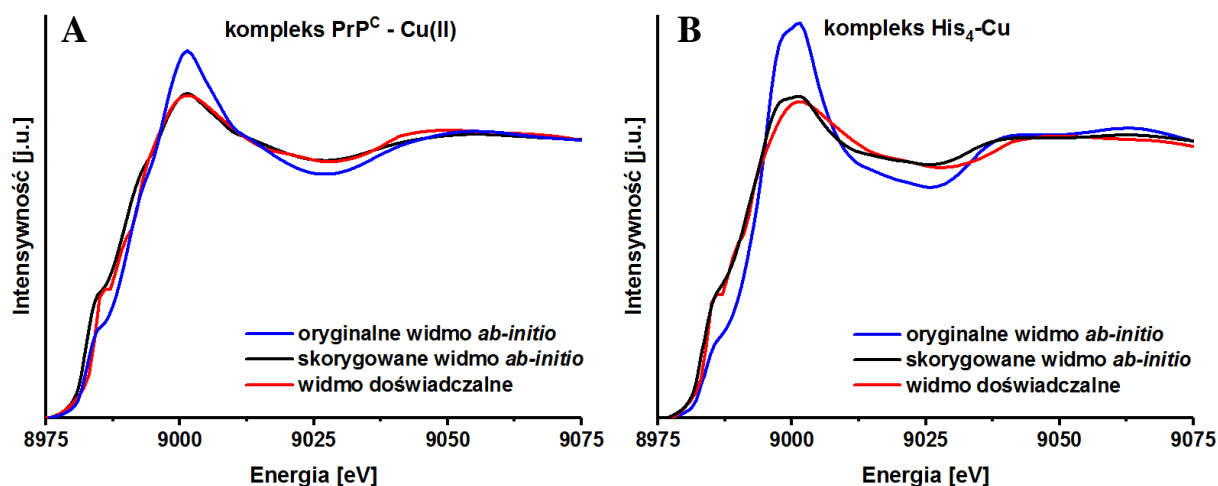


Rysunek VI. 7 Zależność osłabienia fluorescencji w próbce od grubości próbki z ilością jonów Cu(II) przyłączonych do białka PrP^C jako parametrem. Inset przedstawia wpływ stechiometrii kompleksu PrP^C-Cu(II) na wartość współczynnika absorpcji dla energii 8046,3 eV.



Rysunek VI. 8 A – Zależność wartości współczynnika absorpcji od energii padającego promieniowania X wyznaczona z tablic NIST dla różnych stechiometrii wiązania $Cu(II)$ przez białko PrP^C ; B – Obliczone w programie FEFF widma XAS kompleksu $PrP^C-Cu(II)$ znormalizowane przy założeniu różnych stechiometrii wiązania miedzi. Dla porównania skali energetycznej, na obu rysunkach pokazano widmo eksperymentalne kompleksu. Przerwana pionowa linia oznacza energie, dla których normalizowano obliczone widma.

parametrem. Rezultaty są pokazane na Rys. VI. 7. Jak można zauważyć przy braku absorbera, pierwotna wiązka o energii 8046,3 eV nadal ulega osłabieniu po przejściu przez próbkę – jest to jednak efekt rozpraszania. Ponadto, wraz ze wzrostem liczny atomów można zaobserwować proporcjonalny wzrost współczynnika absorpcji (insert do Rys. VI. 7) w sumie o 13,5 %. Z kolei dla próbki o grubości 0,05 cm, osłabienie pierwotnej intensywności fluorescencji wynosi około 80 %. Obliczone wartości wskazują zdecydowanie na obecność efektu samoabsorpcji. Wykorzystując wyznaczone gęstości białka, dla każdej stechiometrii obliczono, przy pomocy wzoru (III.16) i opisanego w rozdziale III programu, korektę samoabsorpcji. W tym celu, aby korekta zadziałała poprawnie, należało ponownie znormalizować widma rentgenowskie względem wzorca z tablic NIST, aby otrzymać wartości bezwzględne w jednostkach $[cm^2/g]$. Wzorzec dla każdej stechiometrii wyznaczano na podstawie wspomnianych tablic dla skali energetycznej obejmującej region przedkrawędziowy i region za krawędzią absorpcji widma XAS. Punkty względem których uzgadniano normalizację w przypadku obliczonych widm dla kompleksu $PrP^C-Cu(II)$ (23-106), są zaznaczone na Rys. VI. 8 A-B pionową linią i ich energie wynosiły kolejno: 8977 eV oraz 9055 eV. Tak przygotowane widma były poddawane korekcie samoabsorpcji w całym zakresie energetycznym i z założeniem grubości próbki równej 0,05 cm, a następnie ponownie normalizowane w celu porównania z eksperymentem. Spośród otrzymanych wyników,

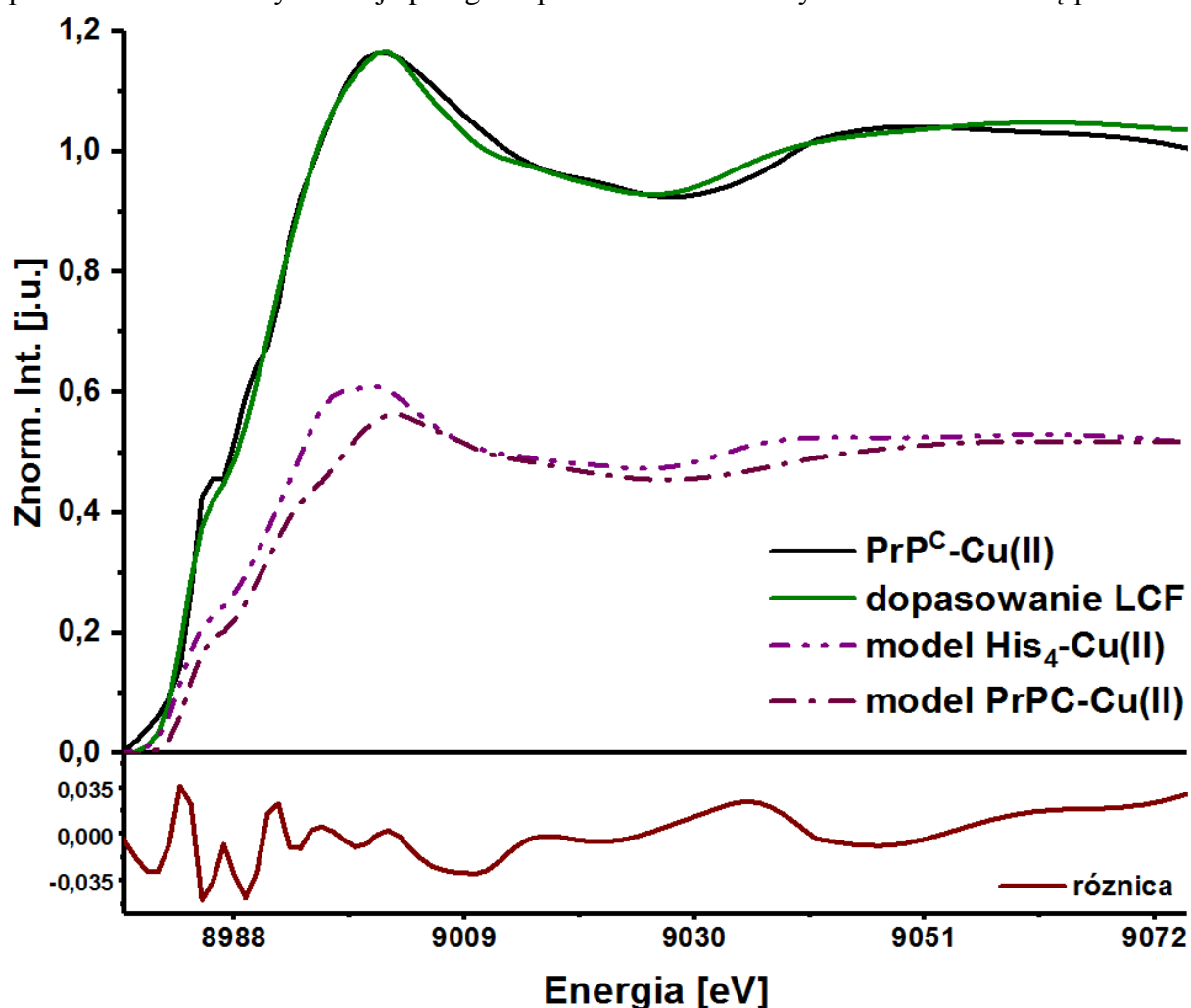


Rysunek VI. 9 Widma obliczone *ab-initio* w programie FEFF przed i po korekcie samoabsorpcji porównane do danych eksperymentalnych: A – kompleks PrP^C-Cu(II); B – kompleks His₄-Cu(II).

najlepsze dopasowanie wykazało widmo ze stechiometrią 1:1 PrP^C : Cu(II), które pokazane jest na Rys. VI. 9 A. Analogiczną procedurę przeprowadzono dla modelu kompleksu His₄-Cu(II), który jest jednym z przewidywanych modeli wiązania Cu(II) w białku prionowym [152], jednakże tutaj znana była stechiometria wiązania próbki. Otrzymana teoretycznie gęstość takiego kompleksu wyniosła $2,005 \text{ g/cm}^3$, współczynnik całkowitej absorpcji dla linii emisyjnej Cu K α_1 wyniósł $10.68 \text{ [cm}^2/\text{g}]$, absorbancja wyniosła 0,8367 co przełożyło się na stosunek $\frac{I}{I_0}$ równy 0,1456. Widmo po korekcie pokazane jest na Rys. VI. 9 B. W obu przypadkach można zauważyć dobrą zgodność między danymi eksperymentalnymi a obliczonymi, gdyż wszystkie istotne elementy widma eksperymentalnego zostały odtworzone. Istnieją jednak pewne rozbieżności. Dla struktury PrP^C-Cu(II) na Rys. VI. 9 A widać je głównie w rejonie przedkrawędziowym, od 8980,5 eV do 8994 eV oraz za krawędzią absorpcji, w rejonie 9038 eV – 9052 eV jednakże jest to niewielka różnica. Obszar głównego przejścia $1s \rightarrow 4p$ oraz rejon za krawędzią absorpcji zostały w tym modelu szczególnie dobrze odtworzone. W przypadku widm modelu kompleksu His₄-Cu(II) pokazanych na Rys. VI. 9 B, w skorygowanym widmie *ab-initio* gorzej odtworzony został region białej linii oraz obszar od 9026 eV do 9044 eV. Z kolei rejon przed krawędzią absorpcji w widmie teoretycznym bardzo dobrze koreluje z widmem doświadczalnym, co zgadza się z wnioskami otrzymanymi na bazie funkcji RDF, iż struktura His₄-Cu(II) jest bardziej uporządkowana i upakowana.

Ostatnim etapem analizy było wykorzystanie otrzymanych modeli do dokładniejszego odtworzenia widma eksperymentalnego. W tym celu wykonano opisaną w Rozdziale III metodę kombinacji liniowej widm (LCF) w programie Athena [53]. Procedura dopasowywania

widm została przeprowadzona dla zakresu energii od 8981 eV do 9074 eV oraz zarówno wagi jak i położenia krawędzi (parametr E_0) zostały wyznaczone. Zakres energetyczny procedury obejmował obszar, w którym algorytm FMS z programu FEFF dawał poprawne rezultaty [66]. Powyżej tego zakresu wyniki obliczeń zostawały obarczone dużą i stale rosnącą niepewnością, a w celu redukcji niepewności należałoby użyć rozwinięcia ścieżek stosowanego w obliczaniu widm EXAFS. Konieczność dopasowania parametru E_0 dla każdego z modeli wynika z faktu iż program FEFF szacuje położenie energii Fermiego z dokładnością do 3 eV [61]. Procedura LCF uzbieżniła się z końcową wartością parametru $\chi^2 = 0,026$. Wagi i wartości E_0 wyniosły odpowiednio 0.50(6) i 1.16(35) eV dla modelu kompleksu PrP^C-Cu(II) oraz 0.52(6) i -0.47(29) eV dla modelu kompleksu His₄-Cu(II). Warto zwrócić uwagę, że suma wag w najlepszym dopasowaniu, w zakresie niepewności wyniosła 1 jakkolwiek nie było to wymaganą opcją podczas obliczeń. Wyniki najlepszego dopasowania wraz z wykresem residuów są pokazane



Rysunek VI. 10 Wyniki dopasowania kombinacji liniowej dwóch modeli teoretycznych do eksperymentalnego widma XAS kompleksu PrP^C-Cu(II) (23-231) zmierzonego przy krawędzi K miedzi. Dolny wykres pokazuje różnicę między dopasowanym widmem wypadkowym (zielone), a doświadczalnym (czarne).

na Rys. VI. 10. Jak można zauważyć na podstawie wykresu różnicowego, największe różnice wystąpiły w rejonie przedkrawędziowym, a także około 9035 eV. Ponadto wartość tych różnic nie przekraczała 5 % maksymalnej intensywności sygnału, a wyniki kombinacji liniowej znacznie lepiej odwzorowały widmo eksperymentalne niż każdy model wiązania Cu(II) z osobna. Dla porównania, wartości χ^2 dopasowania pojedynczych widm modeli His₄-Cu(II) i PrP^C-Cu(II) do widma eksperymentalnego wyniosły odpowiednio 0,106 i 0,087. Jakość dopasowania poprawiła się w rejonie przedkrawędziowym i obszarów wokół energii 9008 eV i 9039 eV. Całokształt stanowi pośredni dowód na to, że Cu(II) w pH 6,5 jest koordynowane w dwóch koegzystujących ze sobą strukturach o względnym stężeniu około 1:1. Pomimo poprawy, widać odstępstwa od danych eksperymentalnych dla energii 9010 eV oraz 9035 eV. Ponadto, pik przy energii 8986 eV nie został do końca odtworzony. Otrzymane względne niepewności wag dla kompleksów His₄-Cu(II) i PrP^C-Cu(II) wynoszą odpowiednio 11.3 % i 11.7%. Te wartości eliminują możliwość błędnego uzbieźnienia procedury LCF, gdyż są to relatywnie małe niepewności. Biorąc pod uwagę powyższe wnioski można stwierdzić, że widmo XAS otrzymane w wyniku procedury LCF, lepiej odtwarza dane eksperymentalne niż widma XAS każdego z modeli His₄-Cu(II) i PrP^C-Cu(II) z osobna.

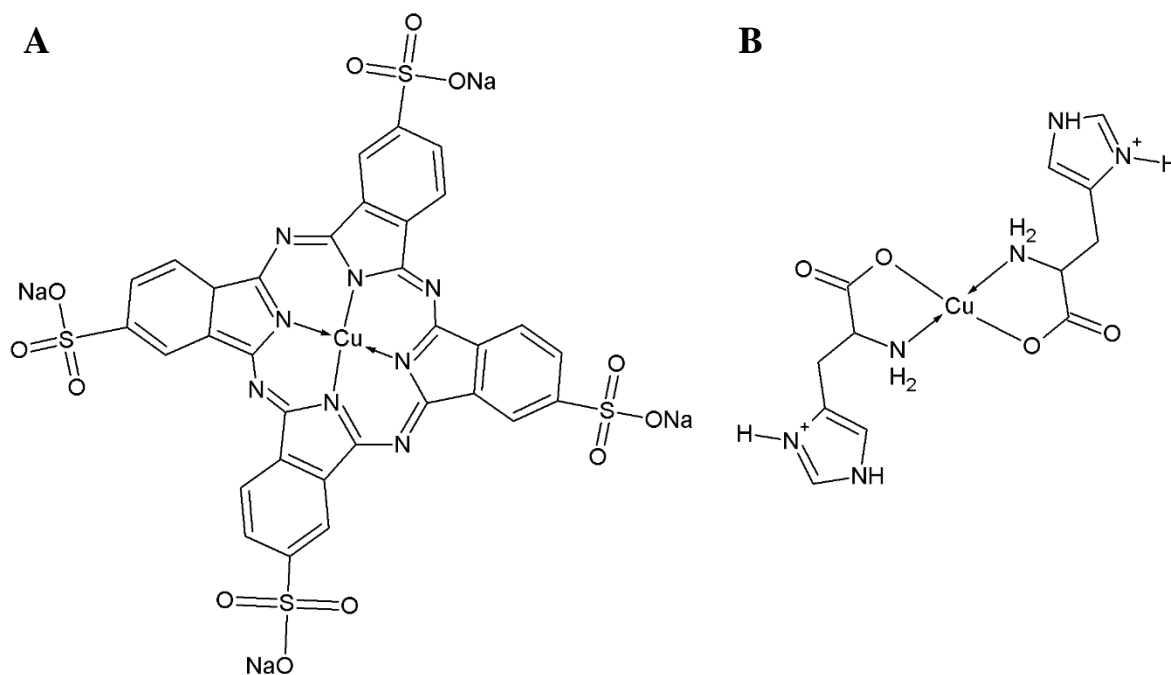
Podsumowując tę część wyników należy zwrócić uwagę na dwa aspekty. Przede wszystkim pole siłowe UFF jest narzędziem z dziedziny dynamiki molekularnej i optymalizacja geometrii z jego użyciem opiera się na minimalizacji potencjału cząsteczki. Takie podejście charakteryzuje się możliwością wykonania szybkich obliczeń nawet dla dużych cząsteczek. Jednakże dokładność wyników może nie być wystarczająca, by osiągnąć poprawną strukturę. Dodatkowo jest znacznie mniejsza niż w przypadku zastosowania wyższego poziomu teorii – DFT. Drugim czynnikiem, na który trzeba zwrócić uwagę jest brak uwzględnienia otoczki hydratacyjnej w obliczaniu gęstości próbki białka. Można założyć, że woda hydratacyjna, która nie została usunięta w procesie liofilizacji, znajduje się w białku w stosunku 0,75 cząsteczki H₂O na 1 resztę aminokwasową na powierzchni [159]. W przypadku białka PrP^C (23-231), oznacza to 156 cząsteczek wody o całkowitej masie 2808 Da. Po zsumowaniu, woda stanowi do 15 % masy białka. Należy jednak pamiętać, iż ilość wody hydratacyjnej w białku to bardzo zmienny parametr. Dla białka PrP^C, wpływ na dodatkowe zmniejszenie ilości cząsteczek H₂O przypadających na jeden aminokwas będzie miał fakt, iż białko ma jedną domenę hydrofobową, a drugą globularną. Domena hydrofobowa będzie znacznie słabiej oddziaływać z H₂O i tym samym zwiąże mniej cząsteczek. Wreszcie, obecność wody hydratacyjnej wpłynie na całkowitą gęstość próbek i wprowadzi błąd systematyczny, który jednak nie zmieni trendu

i wyciągniętych wniosków. Otrzymane wyniki są więc jakościowo oraz, z marginesem błędu rzędu 15 %, również ilościowo poprawne.

W toku badań nad zliofilizowaną próbką kompleksu PrP^C-Cu(II) (23-231) opracowano metodologię badania kompleksów ludzkiego białka prionowego z jonami metali na +2 stopniu utleniania. Używając techniki XAS po raz pierwszy zbadano kompleks PrP^C-Cu(II) (23-231) oraz wykazano, iż w pH 6,5 jon miedzi się nie redukuje. Ponadto, w próbce znajdowały się przynajmniej dwie formy kompleksu PrP^C-Cu(II). W pierwszej z nich jon Cu(II) był koordynowany przez 3 atomy N i 2 atomy O, a w drugiej przez 4 atomy N pochodzące z pierścieni imidazolowych Histydyny. Niewątpliwą przewagą otrzymanych wyników nad dotychczasowymi jest fakt, iż udało się wykonać pomiar całego kompleksu białka w roztworze wodnym, bez dodatkowych stabilizatorów i sond. Było to możliwe dzięki selektywnym własnościom promieniowania rentgenowskiego i technice XAS.

B. Pomiar XAS wodnego roztworu kompleksu PrP^C-Cu(II) na wiązce SuperXAS w PSI

Następne w kolejności zostały wykonane eksperymenty na wiązce SuperXAS w PSI na próbkach ciekłych. Pomiar był prowadzony w temperaturze pokojowej, jednakże z bardzo krótkim czasem akwizycji widma na punkt. Zredukowało to czas akwizycji pojedynczego widma XAS, co w rezultacie dało dużą statystykę pomiarów. W tym eksperymencie celem było szczegółowe zbadanie 5-krotnej koordynacji jonu Cu(II) w kompleksie z białkiem prionowym



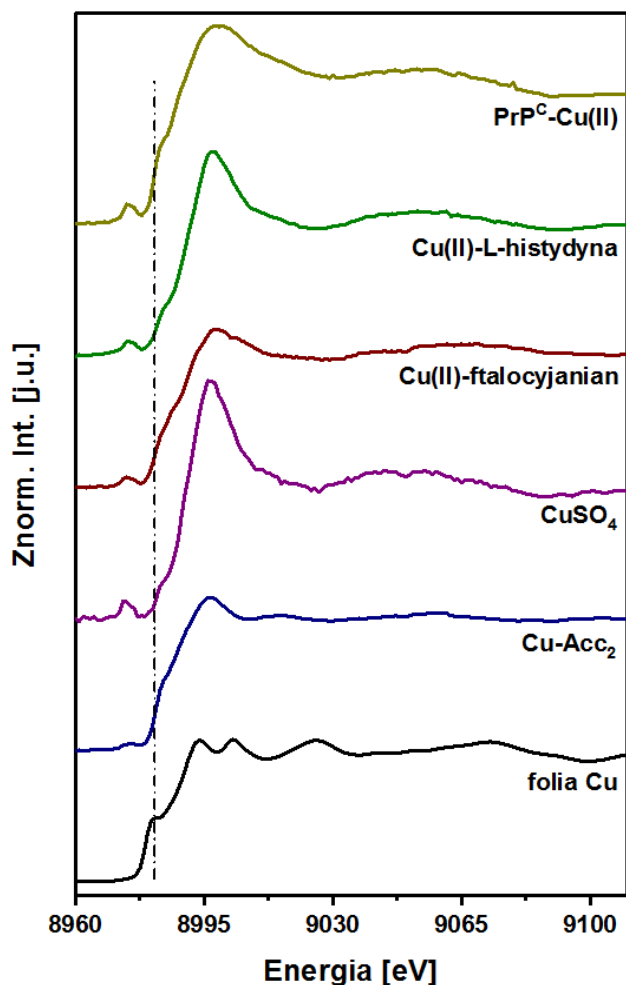
Rysunek VI. 11 Wzory strukturalne referencje organicznych użytych w trakcie pomiarów XAS przy krawędzi K Cu próbek ciekłych kompleksu PrP^C-Cu(II): a) Cu(II)-ftalocyjanian; b) Cu(II)-L-Histydyna.

w możliwie jak najbardziej natywnych warunkach. Wiązanie jonów Cu(II) w takiej strukturze było już przewidziane w literaturze [106–108] i w poprzednim eksperymencie, opisanym w rozdziale VI. A [141]. W tym wypadku analiza danych była nieco uproszczona gdyż ze względu na bardzo niskie stężenie badanych próbek (50 μM), efekt samoabsorpcji można było pominąć. Dodatkowo, otrzymane wyniki pozwoliły dokładniej zbadać strukturę elektronową kompleksu PrP^C-Cu(II).

Aby zrozumieć właściwości oraz poznać strukturę elektronową kompleksu PrP^C-Cu(II) (23-231), należy również porównać ją do zmierzonych referencji. Jak wcześniej, folia zawierająca czysty Cu(0) posłużyła do kalibracji układu i określenia położenia krawędzi absorpcji K czystej miedzi, wynoszącej 8979 eV. Cu(II)-Acc₂ pełnił rolę modelu dla bufora. Po oczyszczeniu białko PrP^C było wysycane Cu(II) w buforze cytrynianowym poprzez dodanie CuCl₂. Bufor zawierał Cu(II)-(CH₃COO)₂ gdyż sól nieorganiczna była dodana przez miareczkowaną w ilości gwarantującej całkowite jej przereagowanie. Dwie kolejne referencje organiczne pokazane są na Rys. VI. 11 A-B. Kompleks Cu(II)-ftalocyjanian zawiera układ sprzężonych grup izoindolowych, a jon Cu(II) jest koordynowany przez cztery aromatyczne atomy N. Ponadto cztery grupy -(NaSO₃) umożliwiają rozpuszczenie się tego związku w wodzie, natomiast ze względu na dużą odległość od centrum metalicznego nie mają wpływu na widma XAS miedzi otrzymywane przy krawędzi K absorpcji. Na Rys. VI. 11 B pokazany jest wzór strukturalny referencji Cu(II)-L-Histydyna. Związek referencyjny został przygotowany tuż przed eksperymentem w kwaśnym środowisku o pH = 4, a synteza prowadzona była w stosunku ilościowym L-histydyny do Cu(II) równym 2:1, zgodnie z protokołem opublikowanym w literaturze [160]. W tym wypadku jon Cu(II) był koordynowany przez 2 atomy O i 2 atomy N i żaden z nich nie pochodził z pierścienia aromatycznego.

W trakcie analizy danych korzystano również z obliczeń *ab-initio* w programie FEFF. Widma były obliczane przy pomocy opisanych już algorytmów SCF i FMS dla potencjałów mieszczkowych atomów. Aby jednak wykonać poprawne obliczenia widm rentgenowskich należało najpierw otrzymać poprawne struktury przestrzenne. W tym celu usprawniono podejście wykorzystane w poprzednim eksperymencie i optymalizację struktury prowadzono metodą DFT w pakiecie Orca 4.002 [161]. Obliczenia DFT są dość długie i wymagają dużej mocy obliczeniowej. Ponadto, bardzo wiele zależy od struktury początkowej. Aby ograniczyć czas obliczeń do minimum każdą strukturę wstępnie optymalizowano przy pomocy pola siłowego UFF w programie Avogadro. Następnie, przy pomocy programu Orca, prowadzono optymalizację otrzymanej struktury w formalizmie DFT. Obliczenia wykorzystywały

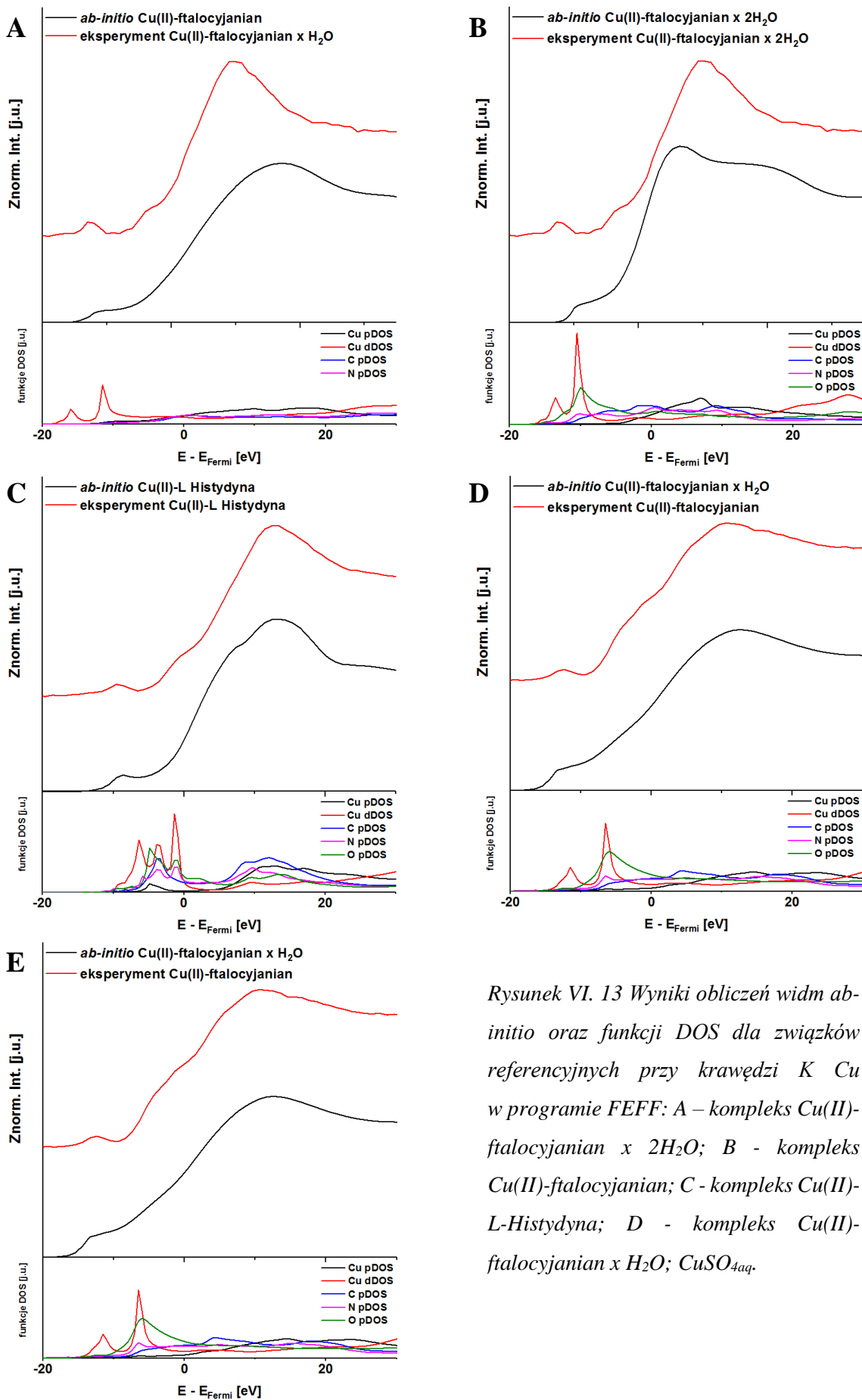
funkcjonał BP86 z przybliżeniem całki odpychania (ang. *Repulsion Integral approximation, RI*), bazą orbitali z polaryzacją rozdzieloną walencyjnie (ang. *split-valence polarization, SVP*) [162] oraz bazą wspomagającą orbitali def2/J [162] dla wszystkich atomów. Ponadto wszystkie obliczenia miały ustawione opcje TightSCF, Grid4 i NoFinalGrid oraz prowadzone były w formalizmie UHF (ang. *Unrestricted Hartree-Fock*), który jest dedykowany spinom połówkowym. Obliczenia prowadzono przy użyciu komputera stacjonarnego wyposażonego w 8 GB pamięci RAM, procesor Intel® Core™i7-4790 CPU @ 3.60 GHz.



Rysunek VI. 12 Widma XAS kompleksu $PrP^C-Cu(II)$ (23-231) otrzymane podczas pomiarów przy krawędzi K miedzi. Pionowa linia orientacyjnie pokazuje obszar przejść $1s \rightarrow 4p + LMCT$.

Widma XAS otrzymane w wyniku pomiarów współczynnika $\mu(E)$ przy krawędzi K miedzi dla kompleksu $PrP^C-Cu(II)$ oraz referencji, pokazane są na Rys. VI. 12. Wszystkie widma zostały znormalizowane i skalibrowane względem położenia krawędzi absorpcji w widmie $Cu(0)$, równym $E_0 = 8979$ eV. Wszystkie widma, oprócz folii miedzianej i $Cu(II)-Acc_2$ wykazują obecność wyraźnego piku przedkrawędziowego w rejonie 8972-8975 eV. Kompleksy $Cu(II)$ mają elektronową konfigurację walencyjną $3d^9$, przez co może dojść do hybrydyzacji stanów d miedzi oraz stanów p ligandu i powstania struktury przedkrawędziowej [134]. W przeciwieństwie do związków $Cu(II)$, związki $Cu(I)$ nie posiadają struktury przedkrawędziowej, gdyż ich konfiguracja walencyjna to $3d^{10}$, co uniemożliwia hybrydyzację. Wszystkie związki wykazują również obecność przejścia wieloelektronowego $1s \rightarrow 4p + LMCT$ zaznaczonego poglądowo na Rys. VI. 12 pionową linią.

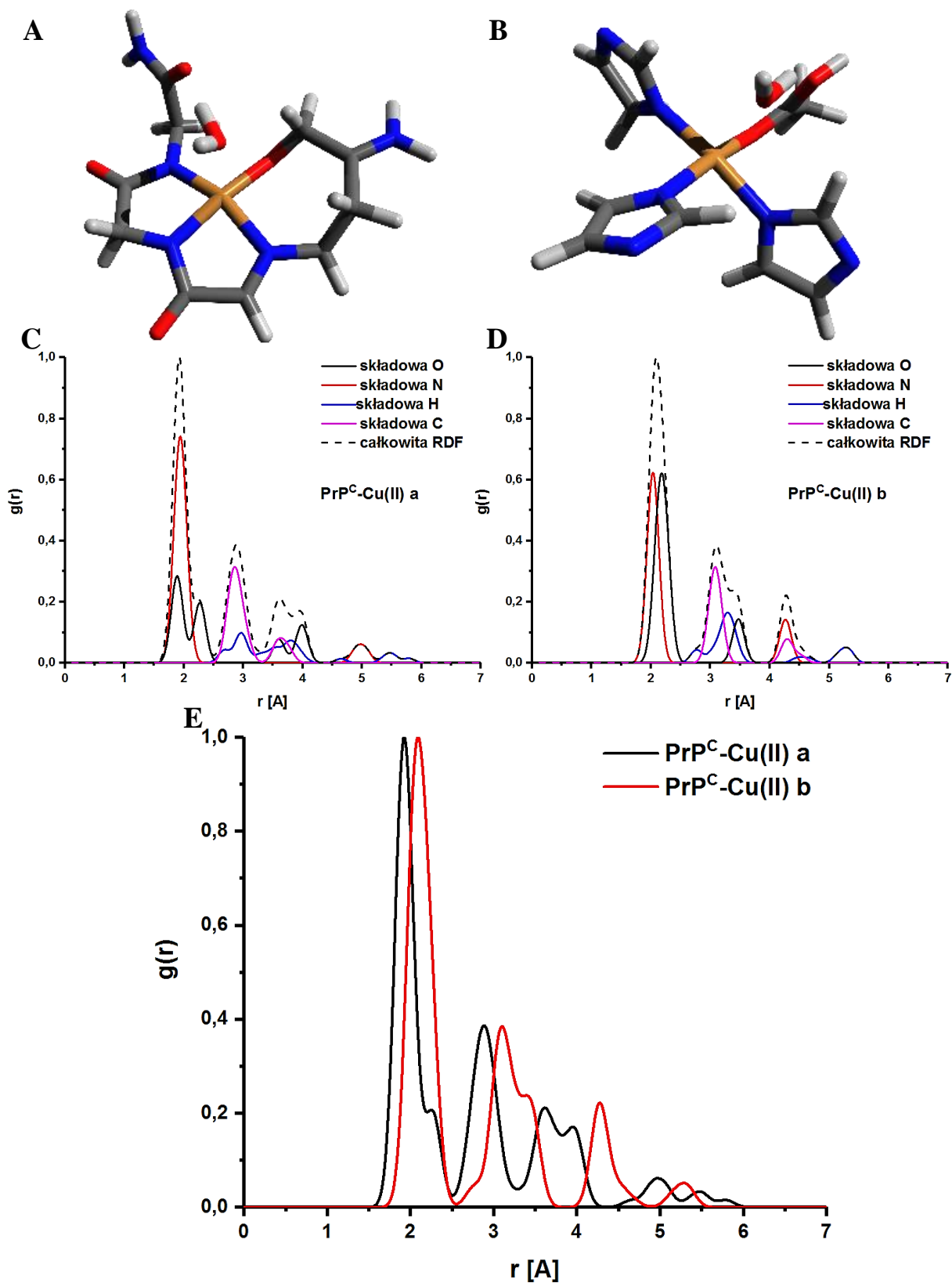
Wkład hybrydyzacji do przejścia $1s \rightarrow 3d$ jest ściśle powiązany z obecnością transferu ładunku w przejściu $1s \rightarrow 4p + LMCT$. Ze względu na swoją naturę oba te przejścia zalicza się do przejść wieloelektronowych, które są bardzo wrażliwe na typ ligandu i geometrię



Rysunek VI. 13 Wyniki obliczeń widm $ab-initio$ oraz funkcji DOS dla związków referencyjnych przy krawędzi K Cu w programie FEFF: A – kompleks Cu(II)-ftalocyjanian x $2H_2O$; B - kompleks Cu(II)-ftalocyjanian; C - kompleks Cu(II)-L-Histydyzna; D - kompleks Cu(II)-ftalocyjanian x H_2O ; $CuSO_{4aq}$.

kompleksu. Aby zrozumieć istotę przejścia $1s \rightarrow 4p + LMCT$ i poznać cechy charakterystyczne struktury elektronowej, w której takie przejścia mogą zajść, obliczone zostały funkcje DOS w programie FEFF 9.6 dla próbek referencyjnych (Rys. VI. 13). W przypadku kompleksu Cu(II)-ftalocyjanianu, ze względu na jego płaską strukturę, rozważono różną hydratację kompleksu: brak cząsteczki H_2O (Rys. VI. 13 A), 1 oraz 2 aksjalne cząsteczki H_2O (Rys. VI. 13 B, C). Najlepiej dane eksperymentalne zostały odtworzone przez kompleks Cu(II)-ftalocyjanian $\times H_2O$ co zostało pokazane na Rys. VI. 13 B. Sugeruje to, iż jony Cu(II) koordynowane przez struktury zawierające elementy aromatyczne i będące w formie roztworów wodnych w rzeczywistości tworzą 5-elementowe centra koordynacyjne o płaskiej podstawie, z aksjalną cząsteczką wody. Zarówno w przypadku braku aksjalnej wody, jak i obecności dwóch cząsteczek H_2O , położenie krawędzi absorpcji było niezgodne z eksperymentem, co widać na Rys. VI. 13 A, C.

Program FEFF nie rozróżnia funkcji gęstości stanów obsadzonych od nieobsadzonych. W trakcie analizy, aby lepiej zwizualizować stany nieobsadzone, przemnożono je przez funkcję skokową (III.1) [93] odpowiadającą modelowemu tłu krawędzi absorpcji, podobnie jak to zrobiono w Rozdziale IV dla związków żelaza. Funkcja przyjmowała dwa parametry. Pierwszy, energia Fermiego, otrzymana została za pomocą algorytmu FMS z programu FEFF, który należało jednak zmodyfikować o ewentualną poprawkę poziomowi Fermiego narzuconą w programie, w karcie EXCHANGE. Drugi parametr to był stabilizowany czas życia wakacji rdzeniowej w stanie Cu $1s$ wynoszący 1,55 eV [163]. Po usunięciu wkładu od stanów obsadzonych można było przejść do bardziej szczegółowej analizy funkcji DOS. We wszystkich otrzymanych wynikach udało się odtworzyć typowe dla związków Cu(II) wzbronione przejście $1s \rightarrow 3d$ w rejonie 8972-8975 eV. Było ono możliwie do zaobserwowania dzięki otwartej strukturze stanów walencyjnych Cu(II) d^9 oraz jej hybrydyzacji z orbitalami typu p ligandów [134]. Jak można zauważyć, we wszystkich związkach organicznych funkcje N pDOS, O pDOS i Cu dDOS nachodzą na siebie w rejonie, przed krawędzią absorpcji. Ponadto, dla kompleksów z istotnym wkładem do funkcji DOS od atomów O i aksjalnym wiązaniem Cu-O, dyskutowane przejście wieloelektronowe jest intensywniejsze ze względu na większy wkład od funkcji O pDOS. Dodatkowo na przykładzie obliczeń *ab-initio* widm XAS dla kompleksów pochodnej ftalocyjanianu miedzi (II), można zauważyć, że ekwatorialny atom O w płaskim kompleksie PrP^C-Cu(II) ma znaczący wkład w lokalną strukturę elektronową. Wniosek o obecności przynajmniej jednej cząsteczki H_2O w strukturze kompleksu PrP^C-Cu(II), jest zgodny z doniesieniami literaturowymi [106–108] oraz z poprzednim eksperymentem. Na koniec, warto zwrócić uwagę na wpływ ligandów będących składnikiem struktur

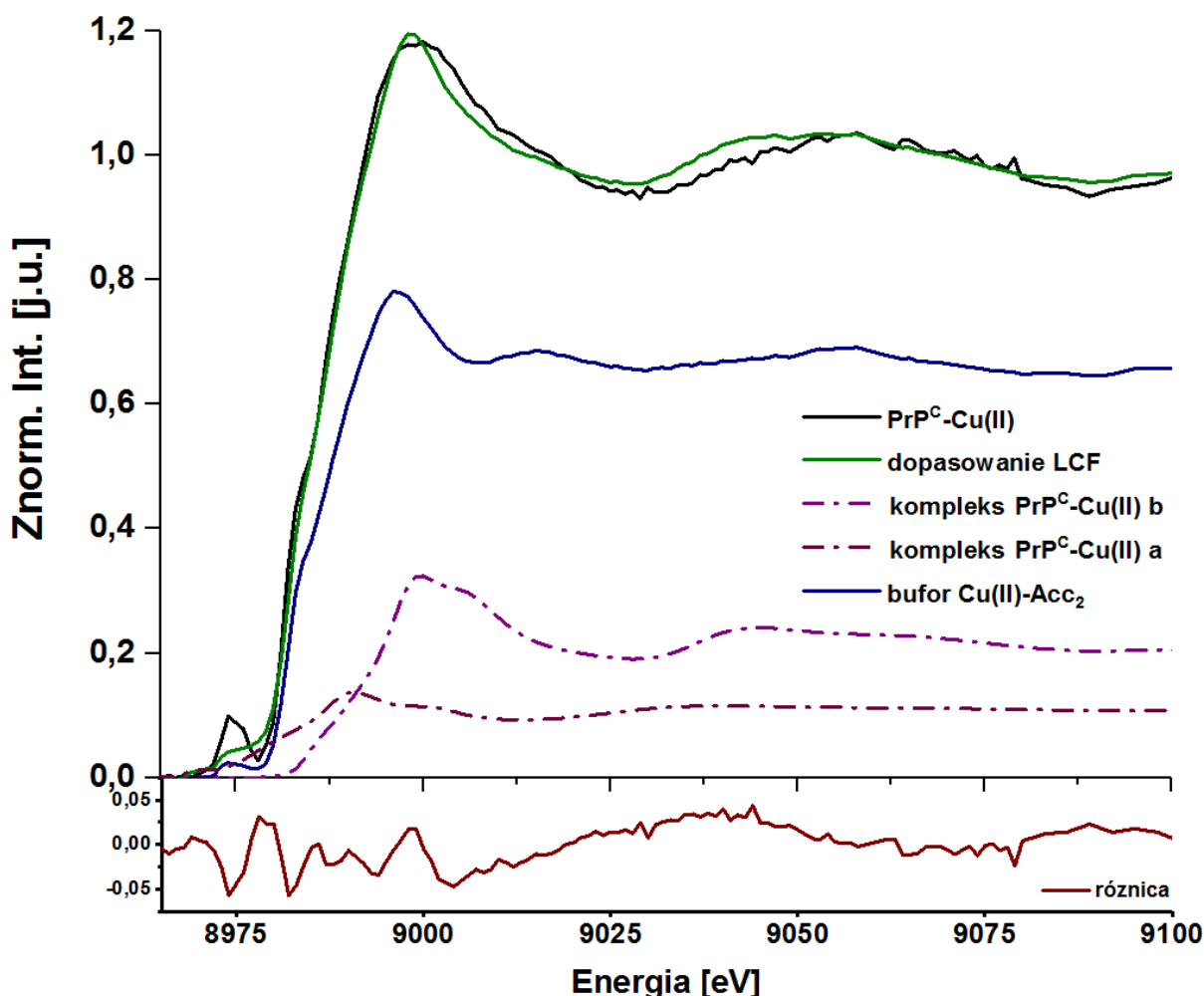


Rysunek VI. 14 Zoptymalizowane metodą DFT i użyte w dalszej analizie struktury kompleksu: A) PrP^C-Cu(II) a; B) PrP^C-Cu(II) b oraz funkcje RDF z uwzględnieniem wkładu poszczególnych pierwiastków dla: C - PrP^C-Cu(II) a i D - B PrP^C-Cu(II) b oraz całkowite funkcje RDF dla obu modeli kompleksów Cu(II). Na rysunkach A-B, oznaczenia kolorów odpowiadają typom atomów: C – szary, N – niebieski, O – czerwony, H – biały, Cu – pomarańczowy.

aromatycznych, w tym przypadku atomów N z pierścieni imidazolowych. Jon Cu(II) koordynowany przez dużą liczbę takich atomów, ma znacznie bardziej wypełnione nieobsadzone orbitale typu d oraz p, co przekłada się na niskie relatywne intensywności funkcji Cu pDOS u Cu dDOS. Inaczej wyglądają gęstości nieobsadzonych stanów elektronowych dla nieorganicznego jonu Cu(II) w CuSO_{4aq}, gdzie funkcja pDOS zdecydowanie dominuje nad resztą. Dobrze widać ten efekt na Rys. VI. 13 D i E.

Następnym krokiem analizy wyników eksperymentu w SLS było wykonanie podobnej do poprzedniej analizy dekompozycji widma eksperymentalnego. Podobnie jak wcześniej, próbka białka została wysycona jonami Cu(II) w stosunku 0.96 : 1 PrP^C do Cu(II). Protokół przygotowania próbek, w tym warunki w jakich następowało tworzenie kompleksów PrP^C-Cu(II), oraz nieco niższe powinowactwo innych miejsc wiążących do wiązania jonów metali pozwoliły wyeliminować możliwość wiązania Cu(II) w rejonie innym niż „octarepeat” [138,141,164]. Należy również dodać, że w toku analizy biochemicznej wykazano, iż w zastosowanym protokole wiązania Cu(II) przez białko PrP^C, region „octarepeat” wiąże Cu(II) z wydajnością 50% (dane nieopublikowane [165]) oraz iż istnieją różne możliwości stworzenia miejsc wiążących Cu(II) przez ten fragment białka. Ponadto, w tym eksperymencie próbki badane były w roztworze wodnym o niskim stężeniu (około 50 μM Cu(II)), zatem efekt samoabsorpcji można było zaniedbać. W przeciwieństwie do próbki zliofilizowanej, w próbce ciekłej należało uwzględnić obecność buforu z jonami Cu(II). W takim przypadku rozsądnie było założyć, że widmo eksperymentalne jest kombinacją liniową przynajmniej dwóch składowych, z których jedna to widmo buforu zawierającego niezwiązane jony Cu(II) w ilości do 50%. Aby móc ilościowo ocenić skład i ilość poszczególnych składników w widmie PrP^C-Cu(II) wykonano procedurę kombinacji liniowej widm referencyjnych przy użyciu programu Athena. W tym celu do analizy wybrano strukturę Cu(II)-L-His₄, Cu(II)-Acc₂ oraz struktury oznaczone jako PrP^C-Cu(II) **a**, PrP^C-Cu(II) **b**, PrP^C-Cu(II) **c**, PrP^C-Cu(II) **d**. Struktury Cu(II)-L-His₄ i PrP^C-Cu(II) **a** zostały zaczerpnięte z wyników poprzedniego eksperymentu, przeprowadzonego na próbkach proszkowych. Oba modele poddano ponownej optymalizacji przy użyciu teorii DFT. Na podstawie wyników poprzedniego eksperymentu i danych literaturowych, struktura Cu(II)-L-His₄ została użyta jako najkorzystniejszy energetycznie model [134] w przypadku niskiego relatywnego stężenia Cu(II): około 100 :1 PrP^C : Cu(II). Analogicznie, model PrP^C-Cu(II) **a** został wykorzystany jako najkorzystniejsza energetycznie struktura w przypadku wysokiego relatywnego stężenia Cu(II) i stosunku około 1:1 PrP^C : Cu(II) [141]. Struktura kompleksu PrP^C-Cu(II) **b** była bardzo podobna do kompleksu Cu(II)-L-His₄, w którym jeden z pierścieni imidazolowych został zastąpiony grupą -COO⁻. Wiele

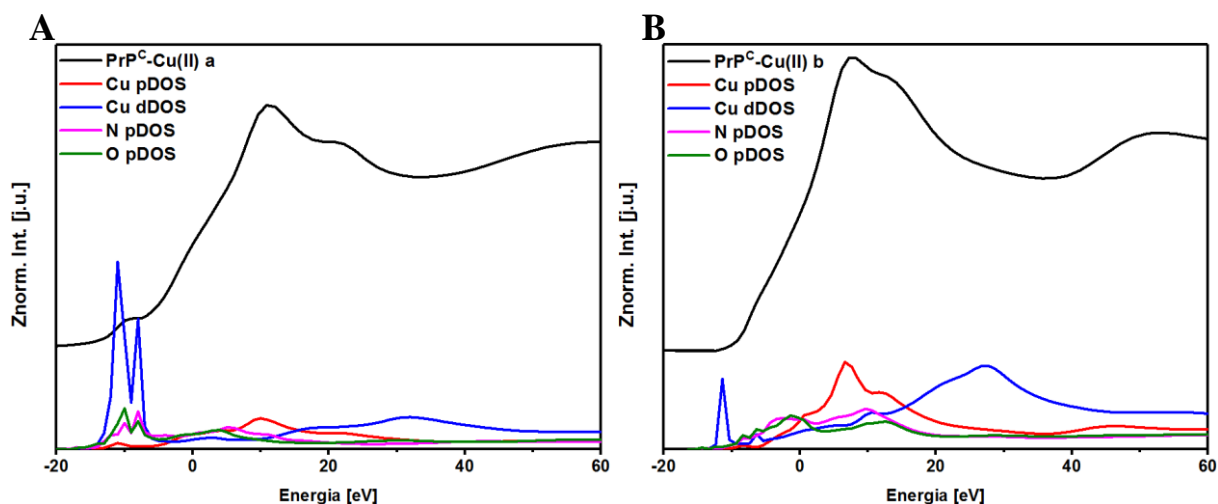
wyników literaturowych sugerowało tego typu środowisko koordynacyjne atomu Cu(II) w białku prionowym [106,110,128,133]. Modele PrP^C-Cu(II) **c** i PrP^C-Cu(II) **d** zostały zaczerpnięte z literatury[133], gdzie były oznaczone kolejno G1 i G8. Związek Cu(II)-Acc₂ reprezentował niezwiązane przez białko jony Cu(II), które pozostały w buforze. Wszystkie związki budowano w programie Avogadro i tam wstępnie ich geometrie były optymalizowane przy użyciu pola UFF. Otrzymane struktury stanowiły modele początkowe do optymalizacji metodą DFT w programie Orca 4.002. W toku obliczeń okazało się, że najstabilniejsze modele dla przyjętych warunków optymalizacji DFT to PrP^C-Cu(II) **a** oraz PrP^C-Cu(II) **b**. Pliki wejściowe do programu Orca, wyniki optymalizacji DFT dla struktur PrP^C-Cu(II) **a** oraz PrP^C-Cu(II) **b** pokazanych na Rys. VI. 14 i które zostały wykorzystane w dalszej analizie, stanowią załącznik do niniejszej Rozprawy. W celu porównania struktur wybranych do dalszej analizy, obliczono dla nich funkcje RDF i porównano je ze sobą (Rys. VI. 14 C-E). Jak można



Rysunek VI. 15 Wyniki dopasowania kombinacji liniowej dwóch modeli teoretycznych: PrP^C-Cu(II) **a** oraz PrP^C-Cu(II) **b** i widma Cu(II)-Acc₂ do eksperymentalnego widma XAS kompleksu PrP^C-Cu(II) (23-231) zmierzonego przy krawędzi K miedzi. Dolny wykres pokazuje różnicę między dopasowanym widmem wypadkowym (zielony), a doświadczalnym (czarny).

zauważyć, model zawierający pierścienie aromatyczne w kompleksie, ponownie ma bardziej uporządkowaną i nieco mniej zwartą strukturę. Następnie, podobnie jak dla związków referencyjnych, dla wszystkich otrzymanych struktur za pomocą programu FEFF9.6 obliczono widma *ab-initio* XAS. Kończącym etapem analizy było przeprowadzenie analizy LCF z uwzględnieniem wszystkich obliczonych widm *ab-initio*. Procedurę przeprowadzono w zakresie od 8967 eV do 9067 eV z możliwością przekroczenia wartości 1 przez sumę wag wszystkich komponentów. Dodatkowo, wszystkie widma *ab-initio* miały dopasowane wartości parametru E_0 , gdyż program FEFF bardzo często przeszacowuje jego wartość. Program w trakcie obliczania strat energii kwazicząstki (pary elektron-dziura) na oddziaływania nieelastyczne i wymienne z otoczeniem, wykorzystuje przybliżenie lokalnej gęstości elektronowej poprzez dobór odpowiedniego potencjału korelacyjno-wymiennego (ECP, opisane szerzej w Rozdziale III). Przykładem takich potencjałów mogą być modele Hedina-Lundquista lub Diraca-Hary [62]. Jednakże, w zakresie XANES widma XAS, wariacje strat energetycznych są bardzo duże ze względu na bardzo niejednorodne otoczenie. Jakikolwiek przybliżenie uśrednionym potencjałem prowadzić może do generowania znacznych błędów zarówno w wartościach parametru E_0 , jak i intensywności pików w widmie [62]. Precyzyjne dobranie parametrów obliczeń pozwala znacznie zminimalizować wspomniane błędy. Najlepsze wyniki kombinacji liniowej zostały pokazane na Rys. VI. 15. Dopasowanie uzbieżniło się dla wartości R równej 0,0044 oraz $\chi^2 = 0,0475$. Trzy przedstawione na Rys. VI. 15 składowe: PrP^C-Cu(II) **a**, PrP^C-Cu(II) **b** oraz Cu(II)-Acc₂ jako jedyne otrzymały znaczące wagi, które wynosiły kolejno: 0,136(28), 0,213(17) i 0,6321(34). Suma wag wyniosła 0,970(79) co w granicy niepewności wyniosło 1. Wykres różnicowy jest pokazany na dolnym panelu Rys. VI. 15, a wartości różnic nie przekraczają 5 % wartości maksymalnej. Warto również dodać, że oba uwzględnione w dopasowaniu końcowym modele teoretyczne zawierają ekwatorialną cząsteczkę wody [166] koordynującą niemal płaskie kompleksy Cu(II).

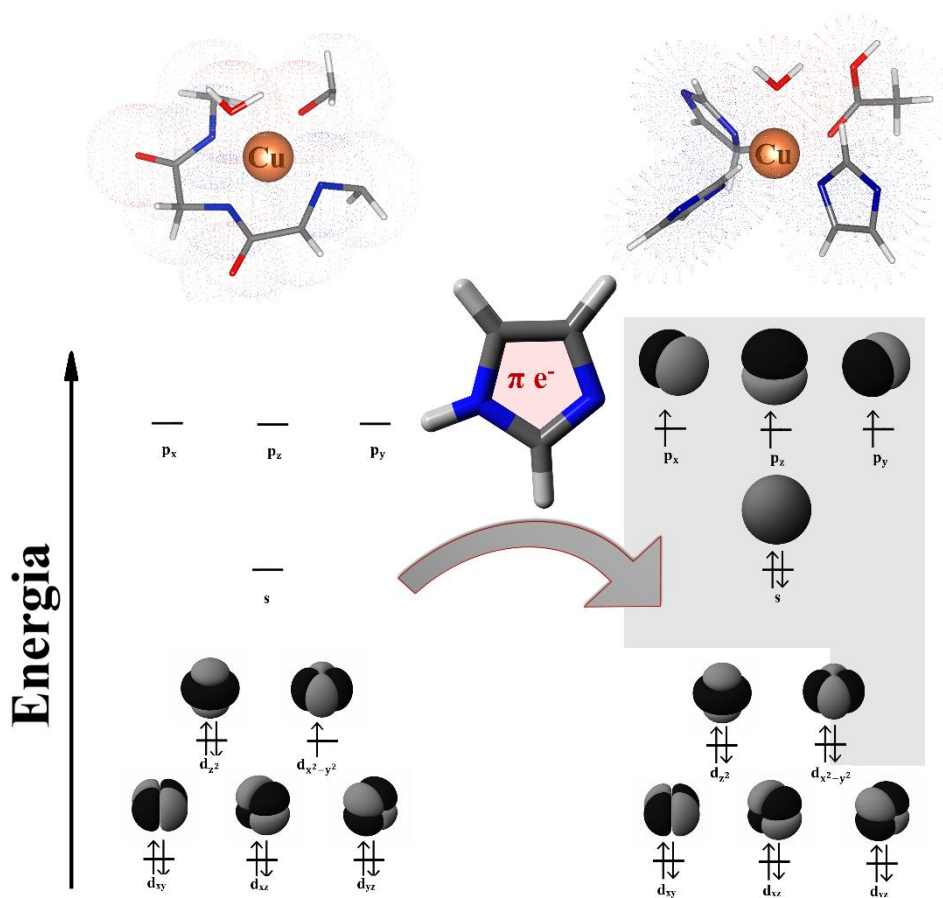
Aby gruntownie zrozumieć naturę oddziaływania białka PrP^C z jonami Cu(II) poddano analizie również funkcje DOS, otrzymane dla struktur PrP^C-Cu(II) **a** i PrP^C-Cu(II) **b**. Podczas analizy wyników w obecnie opisywanym eksperymencie do otrzymania struktur wykorzystano teorię DFT. Geometrie prostych układów małowcząsteczkowych, takich jak pokazane na Rys. VI. 14, teoria ta optymalizuje z dużą dokładnością, wystarczającą, aby obliczyć wiarygodne funkcje DOS. Funkcje DOS zostały, podobnie jak widma *ab-initio*, obliczone w programie FEFF przy użyciu potencjałów korelacyjno-wymiennych Hedina-Lundquista, Diraca-Hary, ich połączenia oraz potencjału symulującego stan podstawowy. Następnie ponownie zostały usunięte wkłady od obsadzonych gęstości stanów. Jak można zobaczyć na Rys. VI. 16 oba



Rysunek VI. 16 Widma *ab-initio* XAS kompleksów A – PrP^C -Cu(II) **a** oraz B – PrP^C -Cu(II) **b** wraz z funkcjami DOS.

modele zostały przedstawione na skali względnej reprezentującej odległość energetyczną od poziomu Fermiego i znacznie różnią się od siebie. Struktura stanów nieobsadzonych w modelu PrP^C -Cu(II) **a** wykazuje w rejonie od -14 eV do -7 eV silną hybrydyzację stanów O pDOS, N pDOS ze stanami Cu dDOS. Ten efekt jest typowy w związkach Cu(II) i odpowiada za powstanie pik przedkrawędziowego w widmie obliczonym, który odtwarza taki sam pik w widmie eksperymentalnym. W obszarze od -3 eV do 3 eV można zauważyć struktury w widmie które na siebie nachodzą – są to kolejno gęstości stanów typu p i d atomu Cu oraz funkcje pDOS atomów N oraz O. Jednocześnie w tym rejonie, w widmach eksperymentalnych występuje pik, oznaczony jako $1s \rightarrow 4p + LMCT$. W zjawisku LMCT zachodzącym w kompleksie PrP^C -Cu(II), atomy ligandów są donorami elektronów. Ze względu na bardzo zbliżone właściwości elektronowe atomów N i O, w widmie doświadczalnym piki pochodzące od transferu elektronów są bardzo blisko siebie. Przejścia $1s \rightarrow 4p + LMCT$ są klasyfikowane tak samo jak główne przejście $1s \rightarrow 4p$ tworzące białą linię. Ich położenie na skali energii względem głównego przejścia wynika z Zasady Zachowania Energii i jest wynikiem przesunięcia o różnicę energii przejścia $1s \rightarrow 4p$ oraz transferu ładunku. Z kolei w obliczeniach *ab-initio* w programie FEFF, funkcje DOS są wyznaczone dla stanu podstawowego, dlatego bezpośrednio nie odwzorowują przejścia LMCT, ale wskazują dla jakich stanów efekt może zachodzić. Duża wakancja w stanach nieobsadzonych d miedzi przy energiach od -14 eV do -7 eV sugeruje, iż kompleks PrP^C -Cu(II) **a** na Rys. VI. 16 A może należeć do związków Cu(III) [167]. Obecność takiej konfiguracji elektronowej z powodzeniem mogłaby tłumaczyć spontaniczną zmianę konformacji kompleksu PrP^C -Cu(II) w formę *scrapie*, gdyż stany Cu $3d^8$ są niekorzystne termodynamicznie. Z drugiej strony, w widmie kompleksu PrP^C -Cu(II) **b**

pokazanym na Rys. VI. 16 B w rejonie od -13 do -10 eV wkład stanów nieobsadzonych typu d Cu do całkowitych funkcji DOS jest bardzo mały. Gdy Cu(II) został skoordynowany przez silne donory elektronów jak na przykład pierścienie aromatyczne, zdelokalizowane elektrony typu π wypełniają puste stany Cu dDOS. Przez wypełnione stany nieobsadzone Cu dDOS nie mogło dojść do hybrydyzacji tych orbitali ze stanami typu p ligandów. Opisany wniosek jest analogiczny do porównania funkcji DOS między kompleksami ftalocyjanianu miedzi (II), Cu(II)-L-Histydyny oraz CuSO_{4aq} na Rys. VI 13. W efekcie, w sytuacji gdy jon Cu(II) został skompleksowany przez dużą liczbę donorów elektronów π , nawet jeśli wymagania geometryczne były spełnione, przejścia 1s \rightarrow 3d nie zachodzą i pik przedkrawędziowy, charakterystyczny dla związków Cu(II) nie występuje. Dla modelu PrP^C-Cu(II) **b** w zakresie energii od -0,5 eV do -8,5 eV ponownie dochodzi do mieszania funkcji Cu pDOS i dDOS ze stanami typu p ligandów. Maksima funkcji N pDOS i O pDOS, ponownie znajdują się bardzo blisko siebie, kolejno przy energiach -4 eV i -2 eV. Model PrP^C-Cu(II) **b** jest bardzo podobny do struktur, które można znaleźć w literaturze [106], co sugeruje poprawność otrzymanych



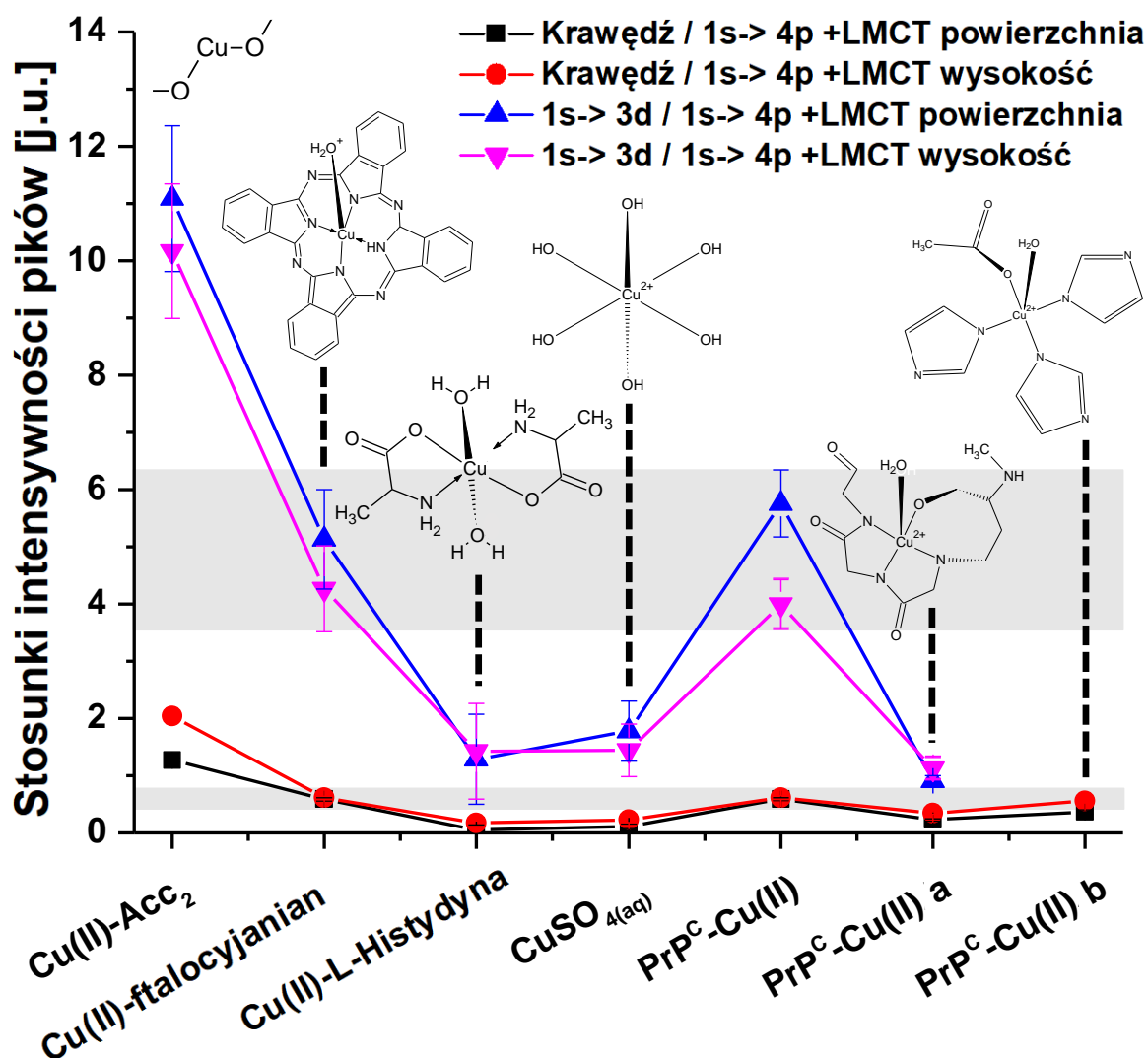
Rysunek VI. 17 Porównanie obsadzenia orbitali atomowych w kompleksach PrP^C-Cu(II) **a** oraz PrP^C-Cu(II) **b**. Transfer elektronów z pierścieni imidazolowych zapelnia orbitale na powloce 4p Cu (szare tło).

wyników. Zoptymalizowane struktury PrP^C-Cu(II) **a** oraz PrP^C-Cu(II) **b** stanowią załącznik do niniejszej Rozprawy.

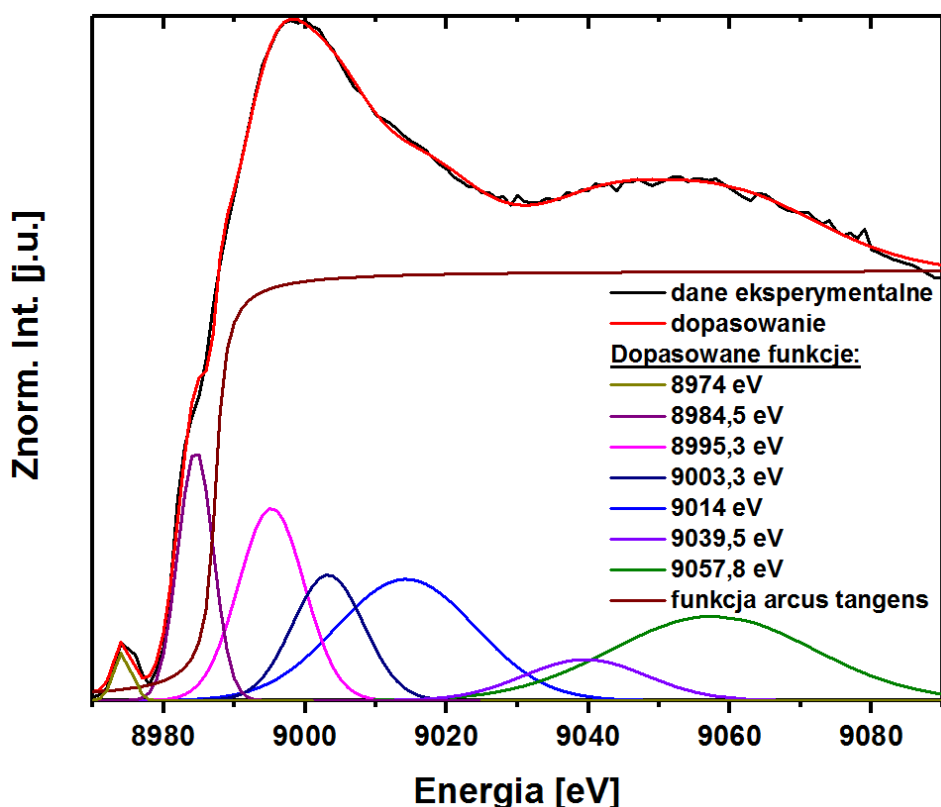
Obie struktury pokazane na Rys. VI. 16 A-B różnią się lokalną geometrią kompleksu i ułożeniem atomów ligandów wokół jonu centralnego Cu(II). Różnica polega na tym, że w modelu PrP^C-Cu(II) **a** struktura kompleksu ma formę silnie zaburzonej tetragonalnej piramidy, podczas gdy zaburzenie w geometrii PrP^C-Cu(II) **b** jest znacznie mniejsze. Jednocześnie, kompleks PrP^C-Cu(II) **a** wykazuje bardzo wyraźną hybrydyzację pomiędzy stanami nieobsadzonymi typu d Cu i stanami typu p ligandów, podczas gdy w kompleksie PrP^C-Cu(II) **b** hybrydyzacja nie występuje ze względu na brak stanów nieobsadzonych typu d Cu. Jak już opisano wyżej, w kompleksie PrP^C-Cu(II) **b** atomy N pochodzące z pierścieni imidazolowych reszt histydyny koordynują jon Cu(II), co powoduje transfer elektronów na atom centralny. Mimo braku hybrydyzacji, wiązania Cu-N i Cu-O nadal są tworzone, jednakże ani orbitale Cu typu s ani d nie biorą udziału w ich tworzeniu. Jedynym rozwiązaniem jest częściowe wypełnienie wirtualnych orbitali Cu 4p przez elektrony π pochodzące z pierścieni aromatycznych. W efekcie, nowo wypełnione stany Cu 4p stworzyły wiązania z orbitalami ligandów, co tłumaczy istnienie stabilnego kompleksu i brak widocznej w funkcjach DOS hybrydyzacji. Zjawisko, w ujęciu orbitali atomowych Cu(II), zostało schematycznie pokazane na Rys. VI. 17. Każdy pierścień imidazolowy może zapewnić 2 elektrony. Opisany efekt jest podobny do rozwiązania zaproponowanego przez Huggins et al. dla Cu(NH₃)₄²⁺, jednakże w tym przypadku nie ma dowodu na wypełnienie orbitalu 3d. Ponadto, pozostałość stanów Cu dDOS dla energii -11 eV w nieobsadzonych gęstościach stanów na Rys. VI. 17 B jest zbyt mała, aby móc ją rozpatrywać jako coś innego niż niepewność obliczeń FMS [55,168,169] i zastosowanego do nich odcięcia stanów obsadzonych. Warto dodać, że opisany transfer elektronu z pierścieni aromatycznych na jon Cu(II) jest bardzo wyraźnym efektem transferu ładunku, gdyż dodatkowo występuje słumienie struktury przedkrawędziowej. Ponadto, różnica pomiędzy strukturami PrP^C-Cu(II) **a** oraz **b** wynika z różnej geometrii obu kompleksów, oraz z różnych konstytucji II strefy koordynacyjnej, bowiem w obu przypadkach I strefa koordynacyjna składa się z 3 atomów N i 2 atomów O.

Transfer elektronów π z ligandów aromatycznych na jon Cu(II) spowodował wypełnienie nowych orbitali atomowych Cu. W widmie eksperymentalnym zjawisko to objawiło się poprzez zanik wzbronionych przejść kwadropolowych 1s \rightarrow 3d i pikę przedkrawędziowego. Zanik ten jest powiązany z powstaniem przejścia 1s \rightarrow 4p + LMCT, który można próbować oszacować empirycznie. W tym celu należy porównać intensywności przejść elektronowych 1s \rightarrow 4p + LMCT oraz 1s \rightarrow 4p. Porównanie intensywności przejść typu

1s → 4p + LMCT z innymi przejściami widocznymi w widmie związku pozwala na scharakteryzowanie związku [145]. Na Rys. VI. 18 zostały pokazane wyniki porównania intensywności oraz powierzchni pod pikami 1s → 4p + LMCT z 1s → 4p oraz 1s → 3d dla wszystkich zmierzonych próbek oraz, dla porównania, dla obliczonych modeli PrP^C-Cu(II) a i b. Procedura wyznaczenia intensywności oraz powierzchni pod pikami została przeprowadzona w programie Athena w zakresie od -25 eV do 55 eV wokół krawędzi K Cu. W celu dopasowania tła absorpcyjnego, wybrano funkcję arcus tangens z ustalonym punktem przegięcia na wartości E_0 . Wartości E_0 otrzymane zostały podczas normalizacji widm, którą przeprowadzono wybierając wartość E_0 w drugim miejscu zerowym II pochodnej widma. W przypadku dopasowywania pików do widm *ab-initio* otrzymanych z programu FEFF, tło



Rysunek VI. 18 Relacje pomiędzy intensywnościami pików odpowiadających przejściu 1s → 4p + LMCT oraz krawędzi absorpcji (1s → 4p) i pikowi przedkrawędziowemu (1s → 3d). Zależność została pokazana dla wszystkich zmierzonych związków referencyjnych, próbki kompleksu PrP^C-Cu(II) oraz, dla porównania uwzględnione zostały także obliczone modelowe struktury PrP^C-Cu(II) a oraz b.



Rysunek VI. 19 Odtworzenie widma XAS poprzez dopasowanie do niego pików w formie funkcji Gaussa oraz funkcji skokowej arcus tangens. Wartości przypisane kolorom na wykresie odpowiadają maksimum dopasowanych funkcji.

zostało odtworzone przy pomocy funkcji błędu, natomiast parametr E_0 był dopasowywany. Wszystkie piki były dopasowywane za pomocą funkcji Gaussa. Przykładowe dopasowanie pików o profilu gaussowskim wraz funkcją skokową arcus tangens, pokazane jest na Rys. VI. 19. Powierzchnie pod pikami były obliczane z poziomem ufności 95 %, zatem niepewność otrzymanych wyników wynosiła 5 %. Należy zaznaczyć, że model $\text{PrP}^{\text{C}}\text{-Cu(II)}$ **b** nie posiadał struktury przedkrawędziowej, więc niemożliwe było wykonanie analizy w tym przypadku. Szare obszary na Rys. VI. 18 oznaczają obszar o znacznym podobieństwie lokalnej struktury elektronowej do kompleksu $\text{PrP}^{\text{C}}\text{-Cu(II)}$, włączając w to niepewności [170]. Podczas porównania wyników należy także pamiętać o tym, że widmo kompleksu $\text{PrP}^{\text{C}}\text{-Cu(II)}$ jest w rzeczywistości kombinacją liniową. Jak można zauważyć, z wykresu wynika, że płaska struktura kompleksu $\text{Cu(II)-ftalocyjnanian x H}_2\text{O}$ jest podobna do modeli teoretycznych i widma eksperymentalnego kompleksu białka. Ze względu na niewielkie względne niepewności porównań krawędzi $1s \rightarrow 4p + \text{LMCT}$ dla kompleksu $\text{PrP}^{\text{C}}\text{-Cu(II)}$ (3,95 % dla powierzchni pod pikiem i 5,12 % dla wysokości piku) oraz względne niepewności porównań $1s \rightarrow 3d / 1s \rightarrow 4d + \text{LMCT}$ (10,21 % dla powierzchni pod pikiem i 10,88 % dla wysokości piku) można stwierdzić podobieństwo struktury elektronowej rozpatrywanych kompleksów Cu(II) .

Oba modele teoretyczne mają stosunki powierzchni pod pikami oraz stosunki intensywności pików tworzących krawędź absorpcji i $1s \rightarrow 4p + \text{LMCT}$ podobne do stosunków w doświadczalnym widmie $\text{PrP}^{\text{C}}\text{-Cu(II)}$ oraz $\text{Cu(II)-ftalocyjanian}$. Z drugiej strony, stosunki $1s \rightarrow 3d / 1s \rightarrow 4p + \text{LMCT}$ w modelu $\text{PrP}^{\text{C}}\text{-Cu(II)}$ **a** są znacznie mniejsze niż w widmie doświadczalnym, natomiast w przypadku modelu $\text{PrP}^{\text{C}}\text{-Cu(II)}$ **b** są niezdefiniowane, ze względu na brak przejścia $1s \rightarrow 3d$ w widmie XAS tego modelu. Takie empiryczne podejście pozwala w sposób jakościowy ocenić względne różnice w konfiguracji elektronowej i wpływie ligandów między poszczególnymi związkami tego samego metalu.

Badanie wiązania jonów Cu(II) do białka prionowego za pomocą spektroskopii XAS jest trudne z powodu kilku aspektów. Przede wszystkim, wszystkie kompleksy organiczne Cu(II) są niestabilne, jeżeli podda się je działaniu intensywnej wiązki rentgenowskiej, mogą relatywnie łatwo ulegać efektowi fotoredukcji [171,172]. W przypadku kompleksu $\text{PrP}^{\text{C}}\text{-Cu(II)}$ dodatkowo widmo po fotoredukcji może mieć bardzo podobny kształt do widma niezredukowanego [133]. Dlatego została przeprowadzona analiza położenia miejsc zerowych w II pochodnej widm absorpcyjnych, która wykazała różnicę względem Cu(0) , podobne jak w przypadku pierwszego eksperymentu. Ponadto, cały eksperyment został zaprojektowany tak, aby zminimalizować ryzyko wystąpienia efektu, nawet kosztem jakości pojedynczego pomiaru. Z kolei duża statystyka pomiarów pozwoliła zredukować widoczne obniżenie jakości pomiaru. W wyniku analizy wyników i zastosowaniu bardziej zaawansowanej, dwustopniowej metodologii optymalizacji geometrii otrzymano lepszej jakości modele wiązania i potwierdzono hipotezę o koegzystencji dwóch środowisk wiążących Cu(II) w próbkach $\text{PrP}^{\text{C}}\text{-Cu(II)}$. Poza pozostałościami buforu zawierającego Cu(II) , w próbce znajdowały się dwa zupełnie środowiska chemiczne Cu(II) , oznaczone jako $\text{PrP}^{\text{C}}\text{-Cu(II)}$ **a** oraz **b**. Pierwsza z nich wykazywała typową strukturę elektronową związku Cu(II) z silną hybrydyzacją stanów Cu d z orbitalami typu p ligandów. W drugiej, elektrony π z ligandów aromatycznych wypełniały stany nieobsadzone Cu , co spowodowało wytworzeniem wiązań pomiędzy stanami Cu 4p i O oraz N 3p bez udziału hybrydyzacji. Podobny efekt zaobserwowano w kompleksie $\text{Cu(II)-ftalocyjanian} \times \text{H}_2\text{O}$. Transfer ładunku ma wpływ na stabilność modelowych kompleksów, co może tłumaczyć na poziomie struktury elektronowej własności neuroprotektoryjne jonów Cu(II) w chorobie prionowej. Dodatkowo, jak zostało pokazane, empirycznie można oszacować właściwości elektronowe badanego kompleksu zawierającego widoczne przejście $1s \rightarrow 4p + \text{LMCT}$, dysponując odpowiednią ilością różnorodnych referencji. Na koniec, należy podkreślić, iż otrzymane wyniki mają zastosowanie ściśle do próbek kompleksu $\text{PrP}^{\text{C}}\text{-Cu(II)}$

otrzymanego w pH 6.5, w stosunku białko : jony równym 1:1, natomiast metodologia pozwala na analizę dowolnych wyników.

Porównując obydwie eksperymenty przeprowadzone na pełnym kompleksie PrP^C-Cu(II) można zauważyć zarówno różnice jak i podobieństwa w otrzymanych wynikach. Przede wszystkim rozpatrywane próbki różniły się otoczeniem i fazą w jakich był dokonywany pomiar. Ponadto, w trakcie analizy danych otrzymanych w wyniku pomiarów próbek wodnych, do otrzymania modeli 3D kompleksów PrP^C-Cu(II) wykorzystano teorię DFT. Jednocześnie należy zaznaczyć, iż środowisko wodne jest bliższe warunkom naturalnym dla białka prionowego. Obydwie argumenty pokazują iż bardziej wiarygodne są wyniki otrzymane dla próbek ciekłych. Warto jednak pamiętać, że opracowany model szacowania stechiometrii wiązania Cu(II) przez białko na bazie skali efektu samoabsorpcji poprawnie przewidział liczbę jonów przyłączonych do białka. Ponadto, różnice w I strefie koordynacyjnej pomiędzy kompleksami PrP^C-Cu(II) i PrP^C-Cu(II) **a** oraz His₄-Cu(II) i PrP^C-Cu(II) **b** są nieznaczne i mogą wynikać zarówno z niedokładności optymalizacji geometrii modeli przestrzennych opartej tylko na potencjale UFF, lub z różnego środowiska badanych próbek.

VI. 4 Podsumowanie

W ramach badania białka PrP^C biorącym udział w procesach amyloidogenezy, wykorzystano metodę XAS. Zbadano kompleksy tego białka z jonami Cu(II) w różnym otoczeniu. Jony Cu(II) najefektywniej tworzą kompleksy metaloorganiczne z tym białkiem, co ma wpływ na rozwój chorób neurodegeneracyjnych. Odnosząc się do celów badań, w szczególności wykazano, że:

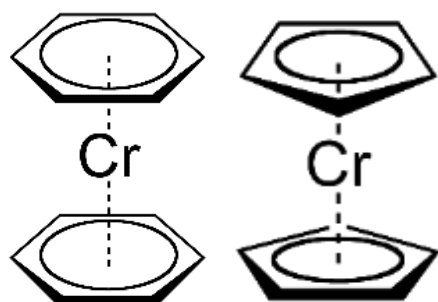
- Wszystkie pomiary kompleksów organicznych zostały wykonane tak, aby zminimalizować zjawisko fotoredukcji kompleksu PrP^C-Cu(II). Dlatego też wykonano pomiary tylko dla zakresu XANES, w wielu punktach próbki i z krótkimi czasami akwizycji. Dla próbek proszkowych opracowano metodologię analizy wyników eksperymentalnych w postaci widm XANES wykorzystującą zoptymalizowane modele struktur kompleksów PrP^C-Cu(II) do obliczeń *ab-initio* i uwzględniono efekt samoabsorpcji. Dla próbek ciekłych zmodyfikowano podejście nie uwzględniając efektu samoabsorpcji;
- Opracowano model szacowania stechiometrii kompleksów organicznych metali w oparciu o obliczenia *ab-initio* widm XANES, zmodyfikowane poprzez dodanie do nich efektu samoabsorpcji;
- W toku analizy próbek zliofilizowanych wyszczególniono dwa otoczenia chemiczne Cu(II) w próbce *huPrP^C* (23-231) oznaczone jako PrP^C-Cu(II) i His₄-Cu(II), wspólnie występujące w próbce w stosunku 1:1 i wyjaśniono nimi kształt eksperymentalnego widma XANES. Podobną zależność stwierdzono dla próbek ciekłych, jednakże w strukturze His₄-Cu(II) zastąpiono jeden z pierścieni imidazolowych grupą COO⁻;
- Zidentyfikowano efekt transferu ładunku w modelowym kompleksie oznaczonym jako PrP^C-Cu(II) **b** powodujący zanik przejścia 1s -> 3d w widmach XANES tego kompleksu. Powstały kompleks jest jednym z dwóch dopasowanych do wyników eksperymentu i okazał się bardzo stabilny. W konsekwencji jego obecność w kompleksie PrP^C-Cu(II) może powodować lokalne ustabilizowanie N-terminalnej domeny białka i ułatwić agregację. Na bazie wyników obliczeń w programie FEFF opracowano empiryczną metodę porównywania struktur elektronowych zbadanych związków tego samego absorbera;

Wykorzystano informację strukturalną zawartą w widmach XANES jak i o strukturze elektronowej jonów Cu(II). Badane próbki były to układy nieuporządkowane, zawierające wiele różnych rodzajów atomów. Selektywność metody XAS pozwoliła ominąć problem heterogeniczności próbek i skupić się jedynie na miejscach wiążących badane jony.

VII. Analiza lipidów poddanych działaniu Cr(VI)

VII. 1 Wstęp

Toksyczność związków Cr(VI) stanowi wyzwanie dla współczesnej medycyny ze względu na rosnące użycie chromu w nowych technologiach i przemyśle. Zatrucie Cr(VI) jest problemem, z którym obecnie nie można sobie w specyficzny sposób poradzić. Problem narasta gdyż chrom jest szeroko stosowany w przemyśle oraz otacza ludzi w życiu codziennym, na przykład w formie stali chromowanej albo suplementów diety zmniejszających łaknienie.



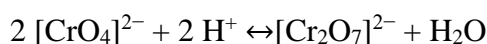
Rysunek VII. 1 Przykładowe sposoby koordynowania atomu Cr przez pierścienie aromatyczne [175].

Bez względu na formę występowania, Cr(VI) jest uważany za silnie toksyczny i kancerogeny czynnik. U człowieka jest immunotoksyczny [173], może wywołać astmę i nowotwory [173,174]. Wykazano także, że spożyty, Cr(VI) zaburza równowagę redoks komórek hepatocytów i prowadzi do ich apoptozy [173]. Na poziomie komórkowym, wzrost stężenia Cr(VI) w znacznym stopniu korelował ze wzrostem aktywności enzymów usuwających wolne rodniki. Proste, jonowe związki Cr(VI) w wodnych roztworach występują w formie uwodnionej. Związki organiczne Cr w dużej części zawierają wiązania koordynacyjne pomiędzy atomem Cr i kilkoma atomami pochodzącymi od cząsteczki organicznej. Takie związki powstają często poprzez reakcje kilkuetapowe, prowadzące przez produkty pośrednie, które mogą mieć charakter rodnikowy. W przypadku obecności rodników, reakcja może przebiegać łańcuchowo. Kompleksy organiczne zawierające Cr mogą mieć stopień utlenienia od -II do VI. Na 0 stopniu utleniania, atom Cr jest z reguły koordynowany przez elektrony π z pierścieni aromatycznych [175], tak jak zostało to pokazane na Rysunku VII. 1. Cr(VI) oddziałuje ze związkami organicznymi, wchodząc z nimi w reakcje redoks. Na przykład, w oddziaływaniu Cr(VI) – błona fosfolipidowa, związek Cr(VI) może wziąć udział w reakcji rodnikowej ze względu na bardzo niską początkową energię swobodną Gibbsa G^0 dla reakcji pomiędzy CrO_4^{2-} i cząsteczek fosfolipidów. W powyższym przykładzie chrom sześciowartościowy redukuje się poprzez niestabilne metastany Cr(V) do stabilnego stanu Cr o niższym stopniu utlenienia [176]. Wolne rodniki zawierające Cr(V) to bardzo silne utleniacze, które z łatwością mogą reagować z elementami błony podczas procesu peroskylacji lipidów [176].

Inne doniesienia wskazują, że Cr(VI) wykazuje zwiększoną przenikalność przez błony lipidowe w porównaniu do Cr(III), przy czym mechanizm przenikania nie został zidentyfikowany [177]. Związki chemiczne Cr(III) w formie kompleksów organicznych są znacznie mniej aktywne i relatywnie stabilne. Spośród wielu kompleksów organicznych Cr(III) warto wymienić pikolinian chromu (III) $[\text{Cr}(\text{pic})_3]^{3+}$, który jest głównym aktywnym składnikiem suplementów diety zmniejszających łaknienie. Cr(III) bierze udział w syntezie organicznej [175] oraz w reakcjach rodnikowych. Jest aktywny biologicznie, co w niesprzyjających warunkach może stanowić zagrożenie dla struktur komórkowych w organizmach żywych. Do niedawna uważało się, że związki zawierające Cr(III), w tym $[\text{Cr}(\text{pic})_3]^{3+}$ są całkowicie bezpieczne, a cała toksyczność chromu wynikała z jego najbardziej utlenionych form. W ostatnich badaniach za pomocą mikroskopii TEM wykazano, że Cr(III) wywołuje śmierć komórek fibroblastów. Ponadto wykazano liczne uszkodzenia nici DNA co wyjaśniono faktem, iż w środowisku komórki Cr(III) może zostać utleniony ponownie do Cr(VI). Ponadto podważono bezpieczeństwo stosowania pikolinian chromu (III), gdyż wykazano powstawanie stresu oksydacyjnego w komórkach traktowanych tym związkiem [178]. Wszystkie te doniesienia silnie sugerują, iż chrom ma szkodliwe działanie na organizmy żywe [177].

A. Wybrane właściwości chromu

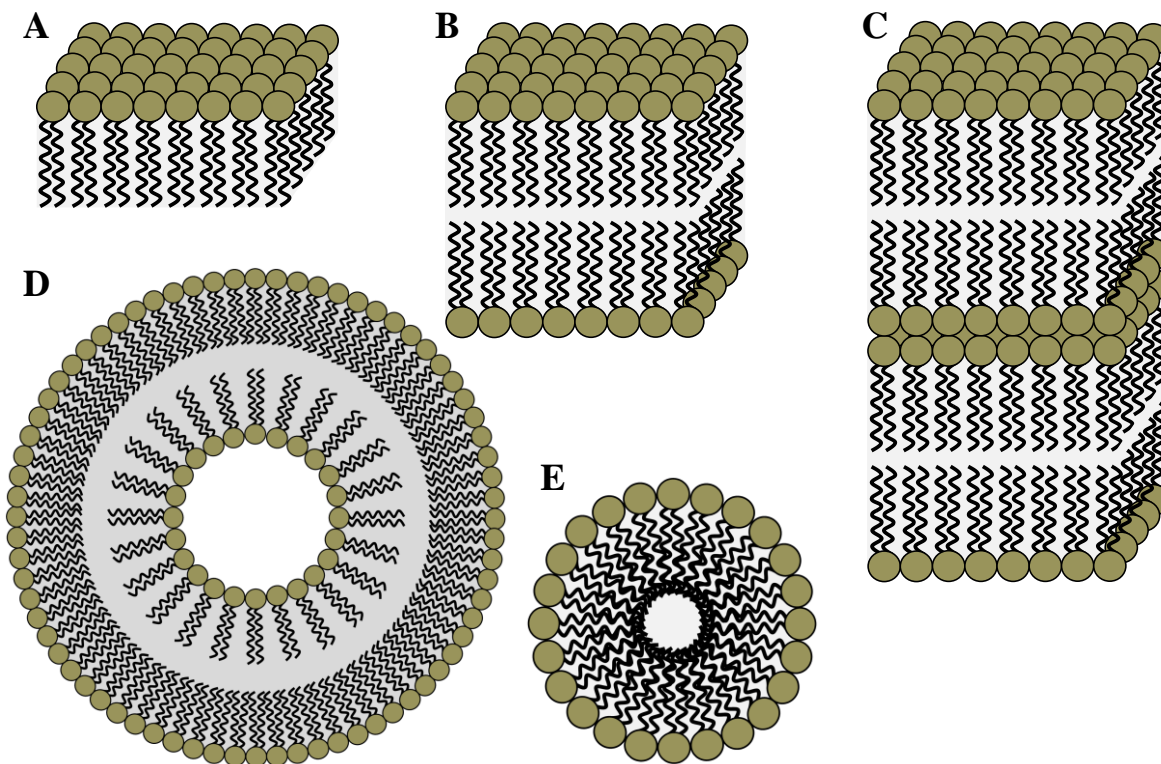
Chrom (Cr) jest to pierwiastek chemiczny z grupy d metali przejściowych Układu Okresowego. W związkach chemicznych może występować w wielu stopniach utleniania [73]: -IV, -II, -I, 0, I, II, III, IV, V, VI, przy czym najbardziej stabilne są związki zawierające Cr(III) oraz Cr(VI). Wraz z Cr(II), związki Cr(III) i Cr(VI) najczęściej występują w środowisku naturalnym [179]. Jednakże z punktu widzenia układów złożonych, chrom w formie Cr(II) jest niestabilny i utlenia się do Cr(III) w reakcji rodnikowej [179]. W układach biologicznych z reguły znaczenie mają tylko związki chemiczne zawierające Cr(III). Struktura elektronowa chromu: $[\text{Ar}]: 3d^5 4s^1$ czyni go układem o otwartej powłoce walencyjnej z niesparowanym elektronem, co umożliwia przeprowadzenie eksperymentów metodą Elektronowego Rezonansu Paramagnetycznego (EPR). Na VI stopniu utleniania najważniejsze w przemyśle i biologii są związki, CrO_3 (bezwodnik kwasu chromowego), CrO_4^{2-} oraz $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, które powstają w wyniku dysocjacji związków KCrO_4 (kwas chromowy) i $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (dichromian potasu) w roztworze wodnym. W wodzie dwa ostatnie związki utrzymują równowagę termodynamiczną poprzez reakcję wymiany:



Powyższa reakcja, tak jak wszystkie inne, w których bierze udział Cr(VI), jest silnie zależna od pH. W niskim i umiarkowanym pH, związki Cr(VI) są silnymi utleniaczami i ich potencjał utleniający maleje wraz ze wzrostem zasadowości roztworu. W środowisku organicznym i biologicznym w każdym przypadku potencjał utleniający Cr(VI) jest wystarczająco silny, aby taki związek mógł się zredukować do Cr(III) [179]. W formie Cr(III) chrom jest najbardziej stabilny (wykluczając oczywiście Cr(0)) i występuje zarówno w związkach organicznych jak i nieorganicznych. Znany jest tlenek Cr_2O_3 , wodorotlenek $\text{Cr}(\text{OH})_3$, liczne sole i kompleksy nieorganiczne Cr(III) jak na przykład: CrCl_3 , $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$, $[\text{CrCl}_2(\text{H}_2\text{O})_4]\text{Cl}$, $[\text{CrCl}(\text{H}_2\text{O})_5]\text{Cl}_2$, $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6]\text{Cl}_3$. Warto dodać, że kompleksy Cr(III) mają liczbę koordynacyjną 6 lub 5. Większość związków Cr(III) i Cr(VI) jest rozpuszczalnych w wodzie.

B. Błony lipidowe

Wszystkie błony komórkowe są zbudowane głównie z amfipatycznych cząstek – fosfolipidów. Fosfolipidy zawierają dwie strukturalne części: hydrofobowy łańcuch alifatyczny i hydrofilową końcówkę skupioną wokół grupy fosforanowej. Poszczególne typy fosfolipidów mogą się między sobą różnić składem grup chemicznych przyłączonych do fosforanu, długością łańcuchów alifatycznych oraz obecnością wiązań podwójnych ($-\text{HC}=\text{CH}-$).



Rysunek VII. 2 Schematy struktur zorganizowanych, tworzonych przez fosfolipidy: A – monowarstwa; B – dwuwarstwa; C – wielowarstwa, tu: czterowarstwa; D – liposom; E – micella.

Ze względu na zawartość wiązań -HC=CH- w części alifatycznej fosfolipidów, rozróżnia się dwie podgrupy tych związków: nasycone (bez wiązań -HC=CH-) oraz nienasycone (zawierające grupę -HC=CH-). Oprócz fosfolipidów, sztuczne błony lipidowe mogą zawierać na przykład glikolipidy, pojedyncze rodzaje białek i cholesterol. W naturalnej błonie komórkowej oprócz fosfolipidów, znajdują się także, cukry, glikolipidy, glikoproteiny, cholesterol oraz liczne białka pełniące role transporterów, kanałów jonowych oraz receptorów. Sztuczne błony lipidowe składają się tylko z fosfolipidów oraz nielicznych dodatków. Obecność fosfolipidów nienasyconych oraz podniesienie temperatury zwiększa płynność błony, podczas gdy dodanie cholesterolu i obniżenie temperatury działa przeciwnie. W środowisku wodnym fosfolipidy układają się tak, aby zminimalizować kontakt części hydrofobowej z wodą. Prowadzi to do powstania różnych struktur przestrzennych, wśród których można wyróżnić pokazane na Rys. VII. 2: płaską monowarstwę (A), dwuwarstwę (B) lub wielowarstwę lipidową (C), liposom (D) oraz micellę (E). Sztuczne modele błon komórkowych są konstruowane tak, aby możliwie wiernie odtworzyć naturalne układy, zachowując przy tym jak największą prostotę.

Liposomy to sferyczne pęcherzyki zbudowane z dwu- lub wielowarstwy fosfolipidów. Ich przekrój może osiągać od około 30 nm do rozmiaru wielu mikrometrów [180]. Liposomy mogą być zbudowane z warstw zawierających jeden lub więcej rodzaju fosfolipidów w zależności od tego, jakie właściwości mają posiadać. Spośród wielu modeli błon lipidowych, liposomy w wodnym środowisku najlepiej odtwarzają własności fizyczne błony komórkowej. Zachowują większość cech naturalnych błon, w tym: płynność, przenikalność dla związków chemicznych, gradient elektrochemiczny w poprzek błony, a nawet w ograniczonym zakresie szczegółową budowę i krzywiznę powierzchni dwuwarstwy [181,182].

C. *Oddziaływanie Cr(VI) z błonami lipidowymi*

Aby związki chromu mogły w pełni uszkodzić komórkę muszą dostać się do jej środka, a zatem muszą pokonać barierę jaką jest błona komórkowa. Cr(VI) może przechodzić przez błony lipidowe poprzez kanały jonowe, za pomocą mechanizmu wymiany anionów fosforanowego i sulfonowego [174,183]. Cr(VI) ma wysoki potencjał przenikania przez błonę lipidową, a w momencie rozpoczęcia przechodzenia przez błonę, zaczyna się redukować do Cr(III) [177,184]. Zaproponowano, że najbardziej niszczącym dla błony efektem oddziaływania z Cr(VI) jest stres oksydacyjny, generowany podczas redukcji [177,184,185]. Proces ten został przebadany za pomocą spektroskopii EPR. Po wyeksponowaniu błony lipidowej na działanie Cr(VI) wzrosła jej płynność, zaobserwowano niestabilne stany pośrednie

zawierające Cr(V) i Cr(IV) oraz zmienił się potencjał elektryczny w poprzek błony [176]. Są to niezaprzeczalne dowody na bezpośrednie oddziaływanie Cr(VI) z błoną fosfolipidową o niepoznanym do końca mechanizmie działania.

Niewiele jest dostępnych wyników literaturowych podejmujących tematykę bezpośredniego oddziaływania Cr(VI) z błonami lipidowymi, Wykonano eksperyment na naturalnych błonach komórkowych *Pseudochrobactrum saccharolyticum* LY10 i przy użyciu pomiarów XAS wykazano redukcję chromu z Cr(VI) do Cr(III) oraz akumulację Cr(III) w próbkach, jednakże powiązano je z utlenianiem warstwy biofilmu na powierzchni błon [186]. N.S. Raja et. al. (2011) wykonał natomiast pomiary przenikalności kompleksów organicznych i związków Cr(III) przez błony lipidowe, jednakże istotną przenikalność przez błonę wykazał trans-[Cr(5-metoksyalicyloheksan), który jest związkiem aromatycznym [183]. Wykorzystując metodę XRD otrzymano dla tego kompleksu struktury jakie mogą się wytwarzać podczas oddziaływania związku z błoną lipidową. Otrzymane wyniki obarczone były jednak znaczną niepewnością, ze względu na półpłynność błony lipidowej [183].

Ze względu na wysoki potencjał utleniający Cr(VI), w reakcji redoks z udziałem tych związków często powstają metastany rodnikowe Cr(V) i Cr(IV) [176] i powinno dochodzić do szybkiego uszkodzenia kanałów jonowych wykorzystywanych w transporcie. Uszkodzenie prowadziło do dysfunkcji takiego kanału i w efekcie do zatrzymania procesu przenikania Cr(VI) przez błony. Tymczasem proces ten nie zwalnia w czasie, a nawet przyśpiesza [177,184], co sugeruje istnienie innego, niezbadanego mechanizmu transportu. Proponowany mechanizm transportu Cr(VI) przez błony komórkowe musi zachodzić przy udziale dwuwarstwy lipidowej, gdyż jest ona jedynym elementem strukturalnym komórki, jaki oprócz kanałów białkowych ma realny wpływ na przenikanie substancji przez błony komórkowe. Ponadto, niezidentyfikowany mechanizm musi uwzględniać proces redukcji z Cr(VI) do Cr(III) lub Cr(IV) [177,184] oraz wzrastającą intensywność dyfuzji Cr(VI) przez błony.

Głównym celem eksperymentu było znalezienie dowodu istnienia proponowanego mechanizmu przenikania Cr(VI) przez dwuwarstwy lipidowe oraz opisanie go poprzez model uwzględniający wszystkie opisane powyżej założenia i warunki oraz własności samych dwuwarstw lipidowych. Dodatkowo, celem eksperymentu było zidentyfikowanie własności błony poddanej działaniu Cr(VI) oraz scharakteryzowanie produktów oddziaływania Cr(VI) z modelowymi błonami lipidowymi.

VII. 2 Opis eksperymentu

Aby osiągnąć zamierzone cele eksperymentu, przygotowane zostały zawiesiny liposomów, a następnie została zbadana ich temperatura głównego przejścia fazowego, T_C . Parametr T_C posłużył do oceny jakości otrzymanych dwuwarstw, gdyż jest on charakterystyczny dla danej błony lipidowej. Następnie, liposomy poddawane były działaniu dichromianu (VI) potasu ($K_2Cr_2O_7$), a cały niezwiązany w błonie Cr był usuwany poprzez przeprowadzenie dializy w temperaturze powyżej T_C . Następnie, próbki były suszone w temperaturze 55 °C i formowane w pastylki. Na tak przygotowanych próbkach wykonano eksperymenty fluorescencji rentgenowskiej (ang. X-Ray Fluorescence, XRF), dyfrakcji rentgenowskiej (ang. X-Ray Diffraction XRD), XAS oraz RXES. Pozwoliły one na zweryfikowanie założenia o chromie, który permanentnie przyłącza się do błon lipidowych oraz na jakościowe i ilościowe opisanie tego procesu.

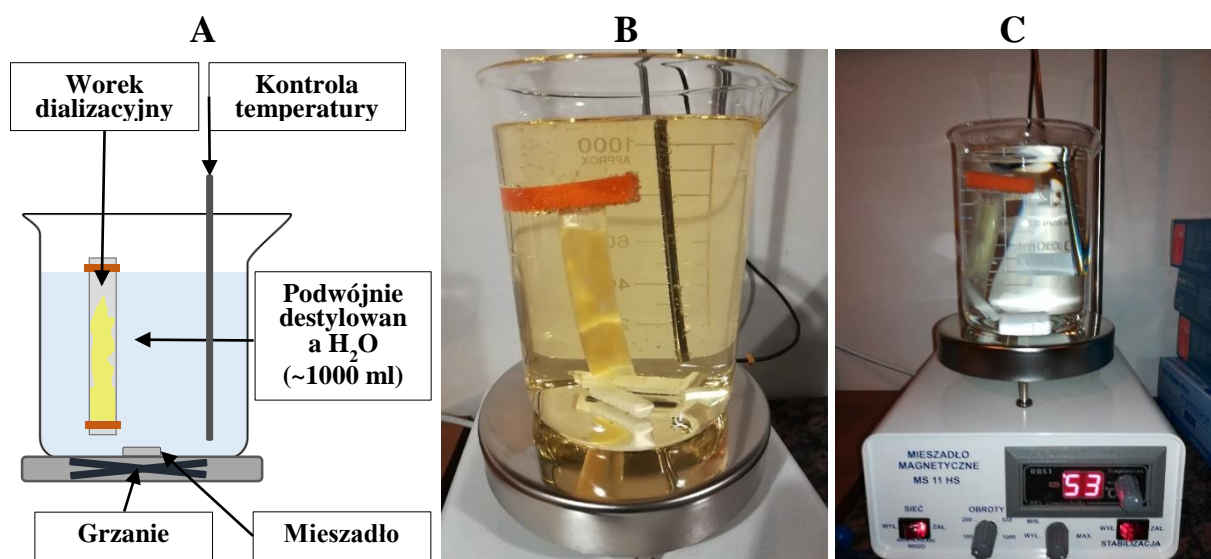
A. Przygotowanie liposomów

Liposomy zostały przygotowane w sposób analogiczny do opisanego w [187]. Do wytworzenia liposomów wybrano fosfolipidy DMPC (1,2-dimirystoilo-sn-glicero-3-fosfocholiny) oraz DOPE (1,2-dioleilo-sn-glicero-3-fosfoetanolaminy). DMPC jest fosfolipidem zawierającym 14 atomów C w łańcuchu alifatycznym i wszystkie wiązania nasycone, podczas gdy DOPE zawiera 18 atomów C w łańcuchu alifatycznym i po jednym wiązaniu nienasyconym ($-HC=CH-$) w każdym z łańcuchów. Oba związki realistycznie odtwarzają własności błon komórkowych i łatwo jest przygotować z nich liposomy. Mieszanki DMPC (*Avanti Polar Lipids* nr kat. 850345P) i DOPE (*Avanti Polar Lipids* nr kat. 850725P) zostały zgodnie z protokołem rozpuszczone w 99 % D_2O (D_2O , *Sigma-Aldrich* nr kat. 435767) do końcowego stężenia fosfolipidów równego 0,15 M. W środowisku D_2O produkcja liposomów przebiega wydajniej niż w H_2O , ze względu na inny charakter oddziaływań między cząsteczkami wody a fosfolipidami. W szczególności, powstałe błony są stabilniejsze, sztywniejsze oraz ruch fosfolipidów jest ograniczony w płaszczyźnie tych błon [188,189]. Przygotowano 5 różnych mieszanin: DMPC, DMPC:DOPE w stosunku ilościowym 100:1, DMPC:DOPE w stosunku ilościowym 10:1, DMPC:DOPE w stosunku ilościowym 5:1 i DMPC:DOPE w stosunku ilościowym 1:1. Obecność wiązań $-HC=CH-$ powoduje zwiększenie płynności błon lipidowych, a stosunki mieszanin fosfolipidów DMPC i DOPE zostały dobrane tak, aby pokryć możliwie jak największy zakres płynności błon modelowych.

Po rozpuszczeniu w D₂O zawiesiny poddawane były sonikacji w łaźni ultradźwiękowej przez 30 minut oraz chłodzone w temperaturze 4 °C przez kolejne 30 minut. Sekwencja była powtarzana 6 razy w celu otrzymania jednorodnej zawiesiny liposomów. Proces wytwarzania liposomów przez ultradźwięki wykorzystuje fakt, iż podczas deponowania energii przez falę ultradźwiękową w wodnej zawieszynie fosfolipidów, powstają bąble kawitacyjne, wokół których może uformować się struktura liposomu. W zależności od mocy ultradźwięków oraz ich częstotliwości można zmieniać rozmiary powstałych liposomów. W niniejszym eksperymencie wykorzystano ultradźwięki o mocy 360 W i częstotliwości 80 kHz.

B. Dodanie K₂Cr₂O₇ do zawiesiny liposomów i przygotowanie próbek

Roztwór K₂Cr₂O₇ (Sigma-Aldrich nr kat. 483044) został dodany do zawiesiny liposomów do końcowego stężenia 0,075 M. Woda destylowana została użyta jako kontrola. Po 15 min inkubacji w temperaturze 21 °C, próbki zostały poddane dializie w celu usunięcia niezwiązanego w błonie Cr. Schemat układu służącego do dializy pokazany jest na Rys. VII. 3 A. Dializa została przeprowadzona w 52 °C, a próbka była cały czas mieszana przy użyciu mieszadła magnetycznego. Procedura była prowadzona w celulozowym worku dializacyjnym Spectra/Por 7 (SpectrumLabs, nr kat. 132103). Dializat był wymieniany po 15 min, 45 min i 19 h. Na Rys. VII. 3 B- C pokazano początkowy i końcowy etap dializy. Przygotowano dwa rodzaje próbek: jedna w formie roztworu wodnego, a druga w formie pastylek. Próbkę wodną



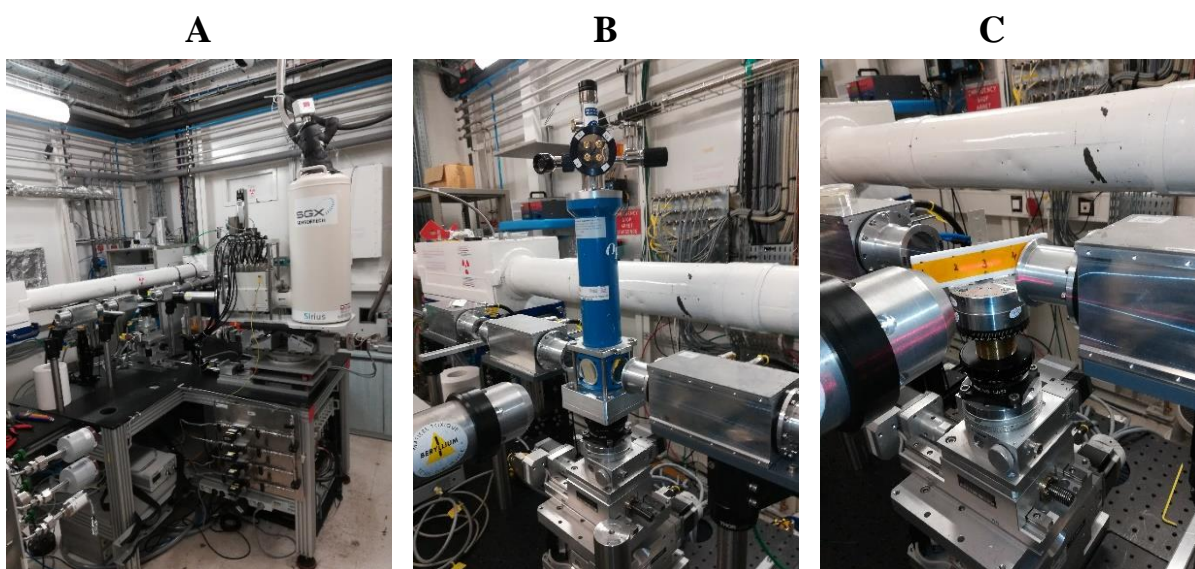
Rysunek VII. 3 Etap dializy próbek poddanych działaniu Cr(VI): A – Schemat układu do dializy próbek; B – zdjęcie dializowanej próbki przed pierwszą wymianą dializatu; C – końcowy etap dializy (19 godzina).

po dializie znajdujące się w fiolkach o objętości 2 ml typu Eppendorf, poddawane były suszeniu w temperaturze 55 °C przez 24 h, a następnie były formowane w pastylki o średnicy 10 mm.

Próbki referencyjne zawierające $K_2Cr_2O_7$, $CrCl_3 \cdot 5H_2O$, Cr_2O_3 i $(C_6H_6)_3Cr(CO)_3$ (wszystkie związki zakupione w firmie *Sigma-Aldrich* o numerach katalogowych kolejno 483044, 27096, 769533 i 119318), były mieszane z celulozą (*Sigma-Aldrich* nr kat. 310697) do końcowego stężenia 7,5 % Cr w suchej masie próbki, a następnie były formowane w pastylki o średnicy 10 mm. Wszystkie pastylki użyte w pomiarach spektroskopowych były montowane na holderach pomiarowych przy użyciu taśmy kaptonowej o grubości 0,06 mm (*GoodFellow*, nr kat. *IM301202*).

C. Pomiary XAS

Pomiary XAS przy krawędzi K Cr (5989 eV) zostały wykonane na wiązce eksperymentalnej BM-25A „SpLine” w European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, Francja). Wnętrze hutch pomiarowego pokazane jest na Rys. VI. 4 A. Dobór energii odbywał się przy użyciu monochromatora typu DCM Si(111) w zakresie od 5800 eV do 6830 eV ze zmiennym krokiem energetycznym, który wynosił: 20 eV dla zakresu energetycznego 5800 eV – 5981 eV, 0,5 eV w zakresie energetycznym od 5981 eV do 6034 eV. W dalszym obszarze krok był zależny od liczby falowej k promieniowania padającego: $k = 0,05 \text{ \AA}^{-1}$ dla rejonu od 6034 eV do 6066 eV i $k = 0,1 \text{ \AA}^{-1}$ dla rejonu od 6067 eV do 6830 eV. Pomiar był wykonywany w modzie fluorescencyjnym przy użyciu 13-elementowego detektora germanowego o wysokiej czystości HPGe Sirius Detector (SGX Sensortech) z czasem pomiaru

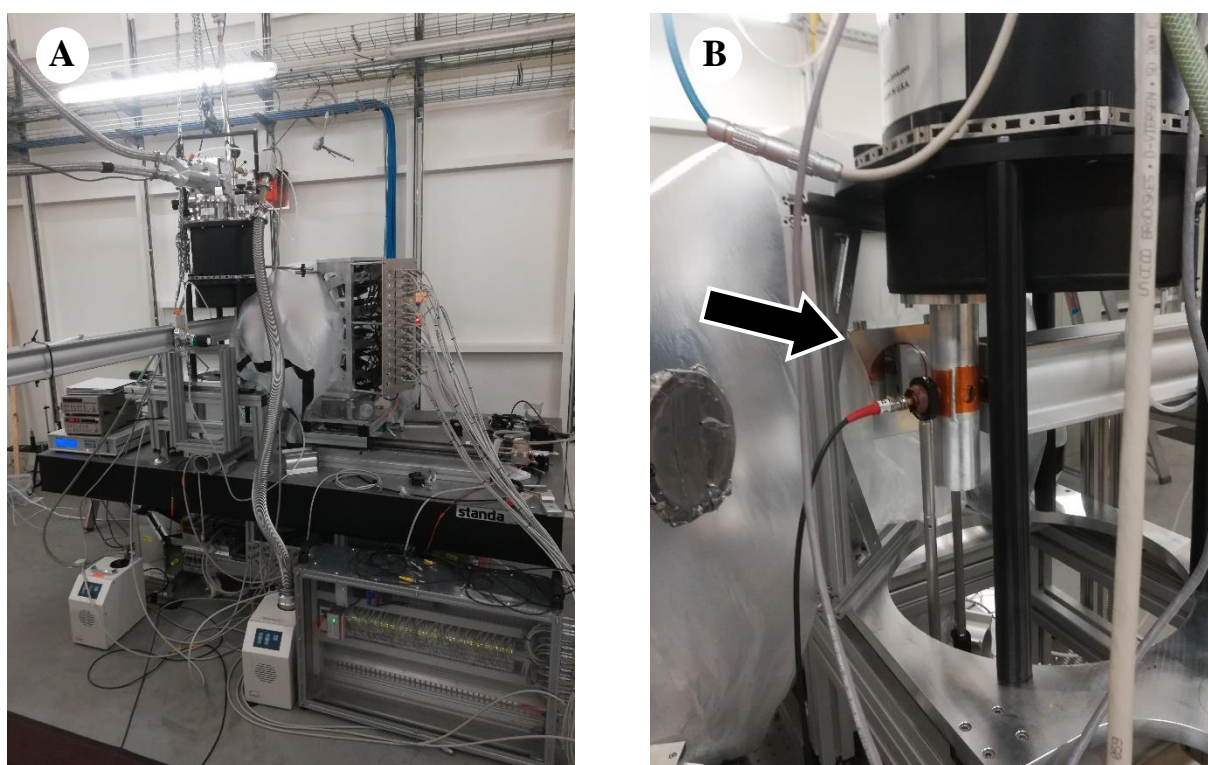


Rysunek VII. 4 A – Widok na wnętrze hutch pomiarowego linii BM-25A w ESRF; B – kriostat helowy do pomiarów próbek stałych w 10 K przygotowany do pomiaru; C – układ do pomiaru próbek ciekłych.

równym 1 s na punkt energetyczny, co skutkowało czasem pomiaru jednego widma ok. 30 min. Pomiary przeprowadzono w temperaturze pokojowej (RT) i w temperaturze 10 K (CRIO), przy użyciu kriostatu wykorzystującego ciekły hel (Oxford, Rys. VI. 4 B). Pomiary w obu temperaturach zostały wykonane w celu oszacowania efektu fotoredukcji. Ponadto, wykorzystano duży przekrój wiązki: 1 x 3 mm i rozmyto profil wiązki padającej w celu zminimalizowania uszkodzeń radiacyjnych. Próbki wodne były mierzone tylko w zakresie widm XANES (5950 – 6160 eV) w RT w celu uniknięcia uszkodzeń radiacyjnych (Rys. VII. 4 B), podczas gdy pastylki były mierzone zarówno w RT jak i w CRIO w całym zakresie energetycznym.

D. Pomiary RXES

Eksperyment został wykonany na wiązce P64, na synchrotronie Petra III w DESY (Hamburg) przy użyciu dyspersyjnego spektrometru von Hamosa z 6 elementowym, krzemowym kryształem analizującym (422) widocznym na Rys. VII. 5 A. Dobór energii odbywał się przy użyciu monochromatora typu DCM Si(111). Mapy RXES zbierano dla energii odpowiadającej linii $K\beta_{1,3}$ Cr w zakresie energii wiązki padającej od 5985 eV do 6000 eV,



Rysunek VII. 5 A – Widok na spektrometr von Hamosa na linii P64 w DESY; B – Zbliżenie na układ pomiarowy w momencie dokonywania skanów widm XANES przy użyciu detektora PIPS (zaznaczony strzałką na rysunku).

z dodatkowymi trzema skanami widm XES dla energii 6200 eV oraz serią pomiarów dla energii 5930 eV, 5935 eV, 5940 eV, 5945 eV i 5950 eV do celów kalibracji. Pomiar kontrolny pełnych widm XANES przy krawędzi K Cr (5989 eV) w zakresie od 5890 eV do 6050 eV wykonano przy użyciu detektora krzemowego PIPS (*Canberra*, GmbH) z krokiem energetycznym 0,5 eV. Układ w trakcie pomiaru tym detektorem pokazany jest na Rys. VII. 5 B. Eksperyment w całości został przeprowadzony w temperaturze 10 K przy użyciu kriostatu wykorzystującego ciekły hel (*Oxford*). Aby zminimalizować straty sygnału spowodowane obecnością powietrza na drodze optycznej fluorescencji rentgenowskiej, cała droga optyczna sygnału była wypełniona helem w temperaturze pokojowej. W tym celu układ pomiarowy został owinięty workiem z cienkiej folii, która wypełniona została gazowym He. Wykonano pomiary referencji: $K_2Cr_2O_7$, $CrCl_3$, CrF_3 , Cr_2O_3 , $Cr(CO)_3(C_6H_6)$, $Cr_2(SO_4)_3$, a także próbek: DMPC + Cr, DMPC:DOPE 10:1 + Cr oraz DMPC:DOPE 1:1 + Cr.

E. Pomiary uzupełniające

Jako uzupełnienie głównych eksperymentów XAS oraz RXES wykonano kilka eksperymentów dodatkowych: pomiar temperatury przejścia fazowego T_C , analiza stężenia Cr metodą XRF próbek liposomów z Cr oraz analiza strukturalna metodą XRD próbek liposomów z Cr.

Pomiar T_C został wykonany metodą spektroskopii w podczerwieni (ang. *Infrared Spectroscopy*, IR) przy użyciu spektrometru IR z transformatą Fouriera (ang. *Fourier Transform Infrared Spectrometer*, FTIR) z wykorzystaniem spektrometru Bruker IFS 66/s z przystawką P/N 21525 (SPECAC) do pomiarów temperaturowych i detektorem DLATGS z rozdzielczością spektralną 4 cm^{-1} . Pomiar prowadzono w zakresie od 2800 cm^{-1} do 3000 cm^{-1} w temperaturach od $10\text{ }^\circ\text{C}$ do $40\text{ }^\circ\text{C}$ z krokiem $2\text{ }^\circ\text{C}$. Ze względu na największą intensywność w widmie IR, do analizy wybrano pasmo rozciągających drgań asymetrycznych grup CH_2 $\nu_{as}(CH_2)$. Pozycje pasm $\nu_{as}(CH_2)$ i $\nu_s(CH_2)$ zostały określone w funkcji temperatury.

Pomiar XRF został wykonany przy użyciu laboratoryjnego źródła promieniowania X, na które składała się lampa rentgenowska L9191 (*Hamamatsu*). Napięcie i natężenie lampy zostały ustawione na 30 kV i 22 μA . Ze względu na fakt, iż kąt emisji promieniowania w tym modelu wynosi 120° , do układu dodano kolimator ołowiany w celu usunięcia rozprożeń. Fluorescencja rentgenowska była rejestrowana przy użyciu detektora krzemowego XR-100CR Si X-Ray Detector (*AmpTek*) z zasilaczem PX2T/CR Power Supply & Amplifier (*AmpTek*) oraz licznikiem wielokanałowym Pocket Multichannel Analyzer MCA 8000A (*AmpTek*). Detektor

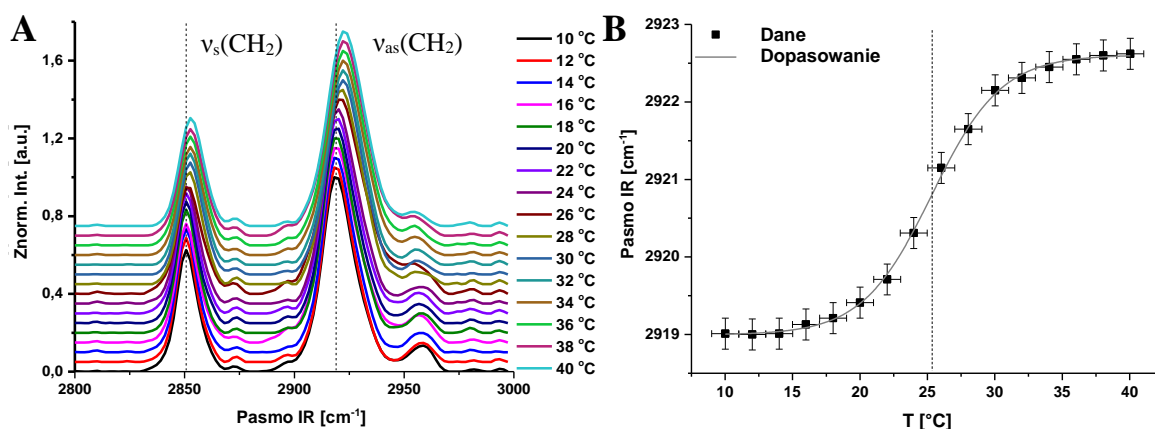
został osłonięty dwoma warstwami folii Al-Pb o grubościach 2 mm (Pb) i 200 μm oraz ustawiony pod kątem 45° , w odległości 10 cm od próbki. W trakcie pomiaru zmierzono wszystkie próbki liposomów poddanych działaniu Cr(VI) w formie pastylek oraz wszystkie referencje.

Eksperyment XRD został wykonany przy użyciu laboratoryjnego dyfraktometru X'Pert PRO (*Panalytical*) z wykorzystaniem charakterystycznych linii emisyjnych Cu $K\alpha$ ($\lambda_1 = 1,541 \text{ \AA}$, $\lambda_2 = 1,544 \text{ \AA}$). Dyfraktometr został wyposażony w grafitowy monochromator oraz krzemowy detektor taśmowy (*X'Ceerator*). Pomiar wykonano w temperaturze pokojowej dla kąta 2Θ obejmującego zakres od 1° do 30° z krokiem $0,0426^\circ/\text{s}$. Aby wyeliminować dodatkowe refleksy pochodzące od podłoża, wszystkie próbki mierzone były na bezrefleksowej płytce krzemowej. Wykonano pomiary wszystkich próbek liposomów poddanych działaniu Cr(VI) w formie pastylek.

VII. 3 Wyniki i dyskusja

A. Analiza FTIR

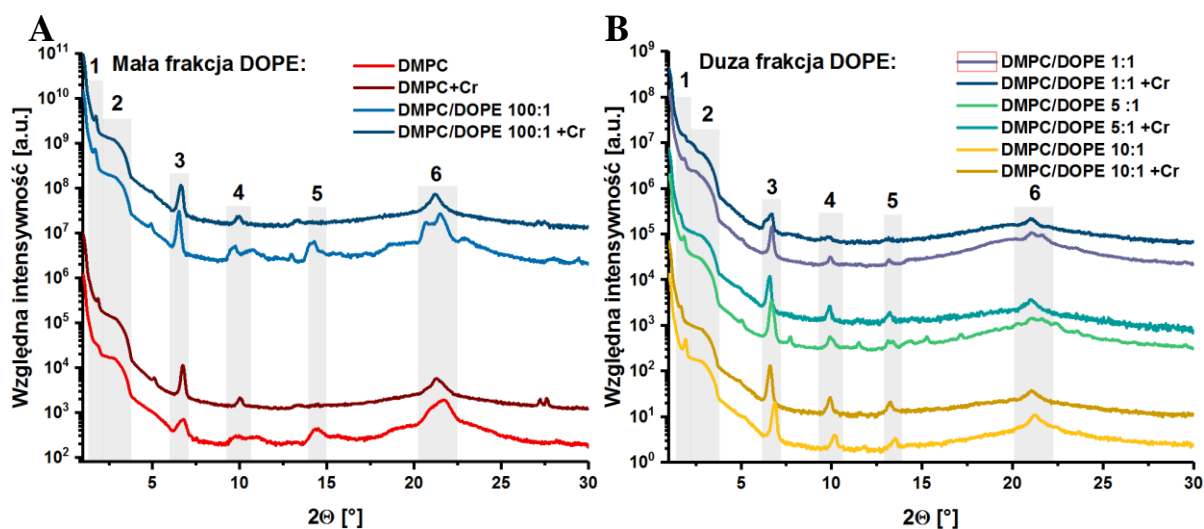
Ze względu na planowane przeprowadzenie dializy powyżej T_c , w fazie półpłynnej, należało tę temperaturę wyznaczyć. Przykładowe wyniki dla liposomów DMPC pokazano na Rys VII. 6, gdzie widać również wyraźne pasma pochodzące od drgań symetrycznych rozciągających grup CH_2 $\nu_s(\text{CH}_2)$. Do położenia pasma $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ dopasowano funkcje Gaussa, a następnie wyznaczono położenia maksimów drgań $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ w zależności od temperatury i dopasowano funkcję sigmoidalną. Punkt przegięcia, będący parametrem dopasowania, zaznaczony na Rys. VII. 6 B odpowiada T_c , która wyniosła 25,3 (2) °C. Wartość ta jest zgodna z danymi literaturowymi [190,191]. Ponadto, jest to najwyższa możliwa temperatura przejścia fazowego w rozpatrywanych próbkach, gdyż dodanie DOPE, zawierającego wiązania – $\text{HC}=\text{CH}$ – obniży wartość T_c [192]. Na potrzebę wytworzenia próbek i dalszych pomiarów ta temperatura została przyjęta, jako wartość graniczna dla przejść fazowych.



Rysunek VII. 6 A – pasma w widmie FTIR, charakterystyczne dla błon lipidowych. Przerywaną linią oznaczono pierwotne położenie pasm $\nu_s(\text{CH}_2)$ i $\nu_{as}(\text{CH}_2)$; B – maksima pasma $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ w funkcji temperatury oraz dopasowana do nich funkcja sigmoidalna. Przerywana pionowa linia pokazuje punkt przegięcia sigmoidy równy T_c .

B. Pomiar XRD

Pomiary XRD przeprowadzono zarówno na liposomach poddanych działaniu $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ jak i na nie poddanych działaniu Cr(VI) . Ze względu na kształt dyfraktogramów liposomów niepoddanych działaniu Cr(VI) można wyróżnić dwie grupy pokazane na Rys. VI. 7 A-B. Pierwsza, nie zawierająca, lub zawierająca małe stężenie DOPE składała się z próbek DMPC i DMPC:DOPE w stosunku ilościowym odpowiednio 100:1. Druga zawierała próbki



Rysunek VII. 7 Wyniki pomiarów XRD próbek liposomów przed i po poddaniu ich działaniu Cr(VI): A – grupa zawierająca mało DOPE (DMPC i DMPC:DOPE 100:1); B – grupa zawierająca dużą frakcję DOPE (DMPC:DOPE 10:1, DMPC:DOPE 5:1 oraz DMPC:DOPE 1:1). Szare tło i numery odpowiadają obszarom charakterystycznym, wyróżnionym na podstawie próbek liposomowych nie poddanych działaniu Cr(VI).

DMPC:DOPE w stosunku odpowiednio 10:1, DMPC:DOPE w stosunku odpowiednio 5:1 oraz DMPC:DOPE w stosunku odpowiednio 1:1. Na podstawie analizy położenia refleksów dyfrakcyjnych wyznaczono 6 obszarów charakterystycznych dla badanych liposomów (szare tło na Rys. VII. 7 A-B). Na podstawie relacji Bragga (II.16) dla zidentyfikowanych refleksów wyznaczono odległości d_{hkl} . Zebrane wyniki są zawarte w Tabeli VII. 1. Porównując obie grupy widać, że te z małą frakcją DOPE są bardziej uporządkowane gdyż wykazują więcej refleksów w widmie XRD, na przykład dla $2\theta = 11,7^\circ$ lub 5° . Jest to zgodne z założeniem, że DOPE zwiększa płynność błony, a co za tym idzie, jej nieuporządkowanie. Jednoznaczna analiza refleksów jest problematyczna, ze względu na półpłynny charakter błony, jednakże na podstawie literatury można przypisać interpretację niektórym refleksom. Pik w rejonie 1.71 - 1.94 Å (oznaczony jako 1) odpowiada za przestrzeń między kolejnymi dwuwarstwami fosfolipidowymi [193]. W rejonie od $2,8^\circ$ do $3,8^\circ$ występuje szeroka struktura w widmie XRD. Błona lipidowa ma cechy dwuwymiarowego ciekłego kryształu i w efekcie lokalna grubość takiej błony może się znacznie wahać, w tym wypadku są to wartości od 57,7 Å do 45,4 Å. Ponadto, eksperymentalna rozdzielczość jest funkcją parametru 2θ i maleje wraz ze wzrostem wartości 2θ . Omawiana szeroka struktura jest wynikiem nałożenia się licznych refleksów występujących obok siebie. Ponadto, to właśnie dla tych wartości zachodzą duże zmiany po dodaniu Cr(VI) do liposomów. Wartości oznaczone 2a i 2b w Tabeli VII. 1 zostały wyznaczone na podstawie punktów przegięcia w II pochodnej widma XRD. Rejon 9° do 20°

2θ obrazuje szczególnie dobrze różnice między grupą widm z dużą zawartością DOPE a widmami DMPC:DOPE 100:1 i DMPC. Przed dodaniem Cr(VI) próbki DMPC oraz DMPC:DOPE 100:1 były mniej płynne, jednakże po oddziaływaniu z Cr(VI) wszystkie próbki miały podobne widma XRD.

Na podstawie znajomości struktury modelowej błony lipidowej można przypisać znaczenia refleksom na dyfraktogramach z Rys. VII. 7 A-B. Odpowiadają one geometrycznym własnościom liposomów, w szczególności: grubości powierzchni, położeniu wiązań –HC=CH– oraz grubości monowarstwy i dwuwarstwy. Na przykład dla liposomów DMPC:DOPE 1:1, refleksy w Tabeli VII. 1 odpowiadają wartościom d_{hkl} : 47,06 Å, 30,31 Å, 23,56 Å, 13,20 Å, 8,90 Å, 6,73 Å, 4,21 Å. I tak wartość 47,06 Å odpowiada grubości dwuwarstwy lub podwójnej grubości monowarstwy lipidowej, natomiast współczynniki d_{hkl} 30,31 Å i 23,56 Å są porównywalne z grubościami monowarstwy lipidowej. Wartości 8,90 Å i 13,20 Å odpowiadają z kolei położeniom wiązań –HC=CH–. Warto jeszcze zwrócić uwagę na zbliżone relacje między położeniem refleksów: $8,9 \text{ Å} / 4,2 \text{ Å} \approx 2,1$, $13,2 \text{ Å} / 6,7 \text{ Å} \approx 2,0$, $47,1 \text{ Å} / 23,6 \text{ Å} \approx 2,0$. Sugeruje to, iż niektóre refleksy mogą być wyższego rzędu niż 1, co jednak nie mogło zostać zweryfikowane w tym eksperymencie.

Warto jeszcze zwrócić uwagę na jedną różnicę pomiędzy widmami XRD DMPC i DMPC:DOPE 100:1, a ich odpowiednikami po dodaniu Cr(VI). Dla DMPC występuje jeden mały refleks przy $28,18^\circ 2\theta$ (równy $d_{hkl} = 3,16 \text{ Å}$), a dla DMPC:DOPE 100:1 dwa małe refleksy przy $28,05^\circ$ i $29,44^\circ 2\theta$ (równe wartościom d_{hkl} kolejno $3,18 \text{ Å}$ i $3,03 \text{ Å}$). Tych struktur nie ma w widmie XRD dla liposomów o większej zawartości DOPE. Tymczasem po dodaniu Cr(VI) w obu widmach wspomniane struktury znikają, natomiast pojawiają się podwójne

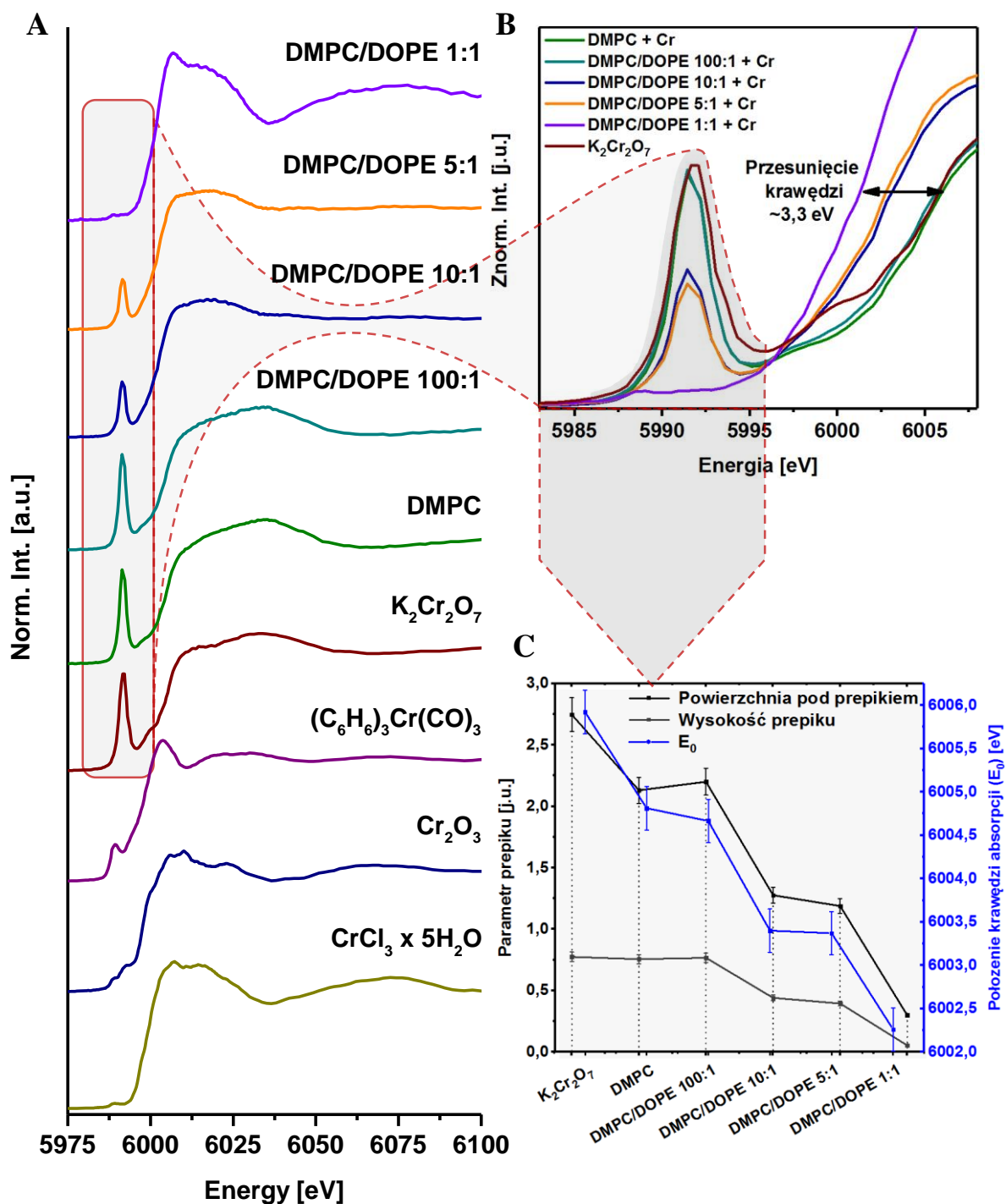
Tabela VII. 1. Wyniki przypisania odległości międzypłaszczyznowych do refleksów oznaczonych na Rys. VI. 4 A-B.

Próbka	Położenie refleksu 2θ / d_{hkl} [$^\circ$ / Å]						
	1	2a	2b	3	4	5	6
DMPC	1,88 / 47,06	2,81 / 31,39	3,71 / 23,77	6,68 / 13,22	9,86 / 8,96	14,44 / 6,13	21,69 / 4,09
DMPC/DOPE 100:1	1,71 / 51,66	2,88 / 30,67	3,71 / 23,77	6,52 / 13,54	9,76 / 9,05	14,27 / 6,20	21,49 / 4,13
DMPC/DOPE 10:1	1,94 / 45,44	2,84 / 31,03	3,71 / 23,77	6,85 / 12,88	10,16 / 8,69	13,51 / 6,55	21,23 / 4,18
DMPC/DOPE 5:1	1,81 / 48,70	2,88 / 30,67	3,71 / 23,77	6,69 / 13,20	9,93 / 8,90	13,37 / 6,61	21,13 / 4,20
DMPC/DOPE 1:1	1,88 / 47,06	2,91 / 30,31	3,75 / 23,56	6,69 / 13,20	9,93 / 8,90	13,14 / 6,73	21,06 / 4,21

refleksy dla DMPC +Cr przy $27,24^\circ$ i $27,60^\circ 2\theta$ (równe wartościom d_{hkl} kolejno $3,27 \text{ \AA}$ i $3,23 \text{ \AA}$) oraz dla DMPC:DOPE 100:1 +Cr przy $27,14^\circ$ i $27,48^\circ 2\theta$ (równe wartościom d_{hkl} kolejno $3,28 \text{ \AA}$ i $3,24 \text{ \AA}$). Grupa liposomów z małą zawartością DOPE ma najmniej płynne błony lipidowe. Eksperyment był zaprojektowany tak, aby Cr(VI) przenikał od zewnątrz liposomu do środka dzięki powstałemu gradientowi elektrochemicznemu. Proces przenikania zaczynał się na powierzchni dwuwarstwy, która jeśli była zbyt sztywna, nie dopuszczała do przenikania Cr(VI) przez błonę. Oba refleksy w widmach XRD DMPC +Cr i DMPC:DOPE 100:1 +Cr można więc skorelować z asocjacją Cr(VI) na powierzchni błony i wytworzeniu nowej, uporządkowanej warstwy atomów, która odpowiada nowym wartościom d_{hkl} .

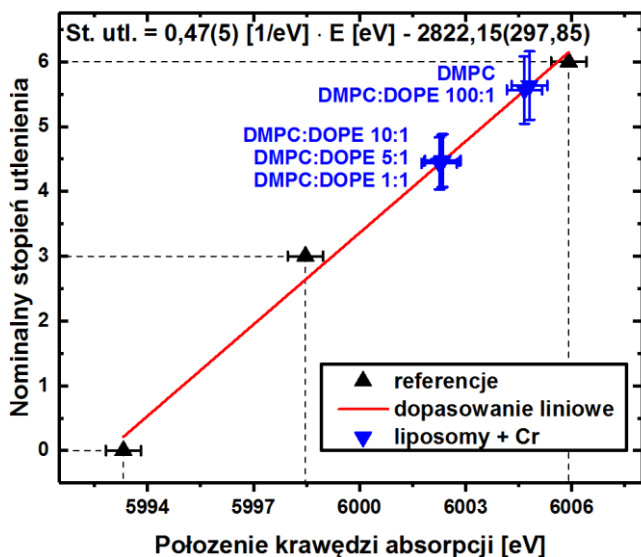
C. *Pomiary XAS i XRF*

Zmianę stopnia utlenienia w wyniku redukcji Cr(VI) podczas oddziaływania $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ z błonami lipidowymi można prześledzić analizując wyniki pomiarów XAS. Na Rys. VII. 8 A pokazane zostały znormalizowane widma XAS otrzymane dla wszystkich próbek liposomowych oraz zmierzonych próbek referencyjnych podczas pomiarów na synchrotronie w ESRF. Wszystkie widma XAS Cr posiadały przejścia elektronowe [194] $1s \rightarrow 3d$, powstałe w wyniku hybrydyzacji stanów $2p$ ligandów i $3d$ Cr w zakresie energii od 5987 eV do 5995 eV oraz przejście $1s \rightarrow 4p$ w zakresie energii od 6000 eV do 6005 eV . Ponadto widma $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ oraz liposomów z małą zawartością DOPE (DMPC + Cr i DMPC:DOPE 100:1 +Cr) wykazywały obecność przejścia $1s \rightarrow 4p + \text{LMCT}$ w rejonie od 5996 eV do 6003 eV [195]. Surowe dane z pomiarów zostały przetworzone w dostępnym na stacji pomiarowej programie SpecConverter 1.6 autorstwa dr Iván'a de Silvy. Normalizację i usunięcie tła przeprowadzono w programie Athena [53]. Widma zostały skalibrowane do pierwszego punktu przegięcia w II pochodnej widma Cr^0 (5989 eV). Ze względu na intensywny pik przedkrawędziowy, dobór E_0 polegał na wybraniu punktu przegięcia leżącego najbliżej połowy wysokości intensywności krawędzi absorpcji. Dodatkowo, zawartość Cr w liposomach okazała się bardzo różna, co można było zaobserwować już w trakcie eksperymentu. Podczas pomiarów w RT, dla próbki DMPC + Cr ilość zliczeń wynosiła 15 na 1 s na punkt energetyczny, podczas gdy dla DMPC:DOPE 1:1 zaledwie 0,5 zliczenia na sekundę. Aby skompensować zmiany, pomiar każdego widm miał inną statystykę, aby otrzymać zbliżone wartości S/N (sygnału do szumu). Z kolei podczas pomiarów w CRIO, próbki musiały zostać przycięte, a przekrój wiązki padającej był dużo mniejszy ($0,3 \text{ mm} \times 0,3 \text{ mm}$) niż wcześniej. Dodatkowo, na drodze optycznej wiązki padającej jak i fluorescencji rentgenowskiej, znajdował się ciekły hel w kriostacie i dodatkowe dwa okienka berylowe. Z tego względu sygnał XAS otrzymany



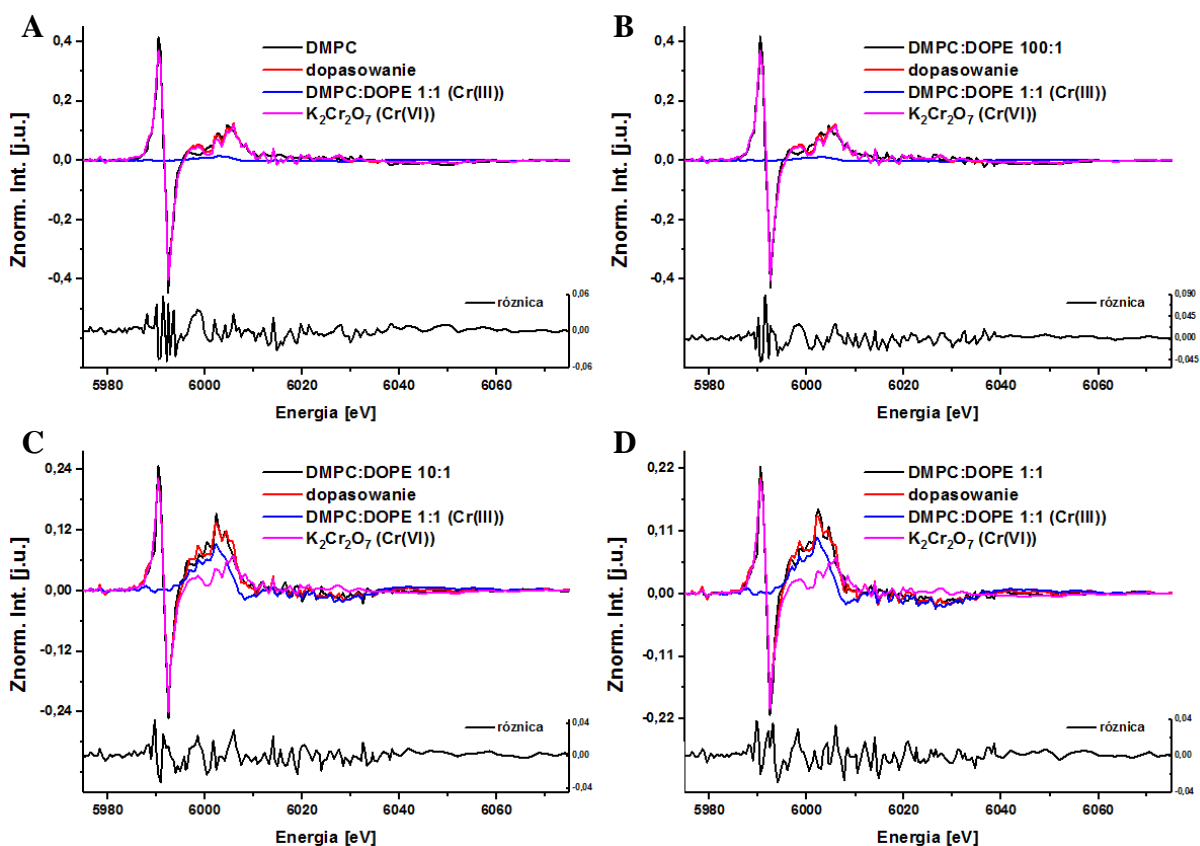
Rysunek VII. 8 Wyniki pomiarów XAS próbek liposomów po poddaniu ich działaniu Cr(VI) oraz próbek referencyjnych: A – widma XAS z zaznaczonym obszarem przedkrawędziowym; B – zbliżenie na obszar przedkrawędziowy zaznaczony w (A). Szarym tłem wyróżniony został pik przedkrawędziowy. Czarna strzałka pokazuje przesunięcie krawędzi absorpcji między widmami $K_2Cr_2O_7$ i DMPC:DOPE 1:1; C – Wykres obrazujący zmienność wysokości i powierzchni pod pikiem przedkrawędziowym oraz położenia krawędzi absorpcji.

z pomiarów CRIO okazał się dużo słabszy i posłużył tylko do oceny obecności uszkodzeń próbki w wyniku naświetlenia jej promieniowaniem X. Jednakże nie stwierdzono różnic pomiędzy wynikami otrzymanymi w CRIO i RT, zatem wnioskuje się, że próbka nie została uszkodzona. Jak można zauważyć wraz rosnącą zawartością DOPE w liposomach, w otrzymanych widmach malał pik przedkrawędziowy, co widać na zbliżeniu rejonu przedkrawędziowego widm na Rys. VII. 8 B. Jednocześnie krawędź absorpcji przesuwała się w kierunku niskich energii, co wskazywało na redukcję z Cr(VI) do niższego stopnia utlenienia. Całkowite przesunięcie wyniosło 3,3(4) eV do wartości 6002.3(4) eV. Jest to dowód na zmianę otoczenia chemicznego atomów Cr. Opisanie zmiany mogły być konsekwencją coraz mniejszego wkładu do widma XAS od struktury przedkrawędziowej w widmie związku $K_2Cr_2O_7$, której maksimum znajduje się w 5991.8(4) eV. Równocześnie powstawały nowe produkty redukcji, których udział stawał się coraz wyraźniejszy w widmach XAS. Nie mogły to być związki Cr(V) gdyż są one bardzo niestabilne [176]. Możliwie natomiast było powstanie związków Cr(III), Cr(IV) lub ich mieszaniny. Zmiany w położeniu krawędzi absorpcji i strukturze pików przedkrawędziowych można opisać ilościowo, co zostało pokazane na Rys. VII. 8 C. Warto zauważyć, że profil zmienności położenia krawędzi i powierzchni pod pikiem przedkrawędziowym są niemal identyczne. Aby sprawdzić, czy powstałe związki mają stopień utlenienia III czy IV, na podstawie widm związków referencyjnych wykonano krzywą kalibracyjną stopień utlenienia – położenie krawędzi absorpcji. Wynik pokazany jest na Rys. VII. 9. Krzywą sporządzono na podstawie dopasowania liniowego położenia krawędzi absorpcji związków $K_2Cr_2O_7$, Cr_2O_3 i $(C_6H_6)Cr(CO)_3$. W celu zidentyfikowania uśrednionego stopnia utlenienia w widmach liposomów ich widma umieszczono na wykresie krzywej kalibracyjnej. Jak można zauważyć uśredniona wartość stopnia utlenienia odpowiadająca liposomom DMPC +Cr oraz DMPC:DOPE 100:1 +Cr wyniosła 5,5(5), natomiast dla pozostałych liposomów uśredniona wartość wyniosła 4,5(5). Znaczny krok energetyczny pomiaru uniemożliwił jednoznaczne odróżnienie widm liposomów wewnątrz grup zawierających dużą i małą frakcję DOPE. Warto jednak zaznaczyć, że próbki zgrupowały się podobnie, jak w przypadku pomiarów XRD, zatem można stwierdzić, że za malejący stopień utlenienia odpowiadają wiązania $-HC=CH-$. Ponadto w próbce DMPC:DOPE 1:1 +Cr, w której nie było już Cr(VI) stopień utlenienia wyniósł co najmniej 4, a nie 3, tak jak pierwotnie zakładano. W celu dokładniejszej identyfikacji stopnia utlenienia Cr w liposomach należało wykonać pomiar XAS z mniejszym krokiem energetycznym. W dalszej dyskusji, jako formę zredukowaną Cr o niższym stopniu utleniania na podstawie krzywej kalibracyjnej i dyskusji powyżej oznaczano jako Cr(IV).



Rysunek VII. 9 Krzywa kalibracyjna położenie krawędzi – stopień utlenienia (czerwona linia) oraz położenia krawędzi absorpcji w widmach liposomów (punkty koloru niebieskiego). Krzywa została sporządzona na podstawie widm XAS związków referencyjnych (punkty koloru czarnego).

Biorąc pod uwagę otrzymane wyniki założono, iż widma XAS liposomów są kombinacją liniową widm $K_2Cr_2O_7$ oraz nieznanego związku Cr(IV) reprezentowanego przez widmo DMPC:DOPE 1:1 + Cr. Założenie o braku Cr(VI) w próbce DMPC:DOPE 1:1 + Cr poczyniono na podstawie kształtu struktury przedkrawędziowej w widmie XAS próbki liposomowej. Aby potwierdzić tezę o stopniowej redukcji Cr(VI) \rightarrow Cr(IV) w funkcji stężenia DOPE, wykonano dopasowania kombinacji liniowych widm eksperymentalnych $K_2Cr_2O_7$



Rysunek VII. 10 Wyniki dopasowania widm XAS DMPC:DOPE 1:1 oraz $K_2Cr_2O_7$ do pozostałych widm liposomów: A – DMPC; B – DMPC:DOPE 100:1; C – DMPC:DOPE 10:1; D – DMPC:DOPE 5:1.

Tabela VII. 2 Wyniki dopasowania liniowego widm XAS DMPC:DOPE 1:1 oraz $K_2Cr_2O_7$ do widm XAS DMPC, DMPC:DOPE 100:1, DMPC:DOPE 10:1 oraz DMPC:DOPE 5:1.

Próbka	Referencja Cr		[Cr(VI)/Cr(IV)]	R
	$K_2Cr_2O_7$ (Cr(VI))	DMPC:DOPE 1:1 (Cr(IV))		
DMPC	0.922(15)	0.078(17)	11.821(355)	0.037
DMPC/DOPE 100:1	0.933(16)	0.067(16)	13.925(46)	0.041
DMPC/DOPE 10:1	0.540(10)	0.460(10)	1.174(235)	0.037
DMPC/DOPE 5:1	0.500(11)	0.500(11)	1.000(220)	0.043
DMPC/DOPE 1:1	0	1	0	N/A

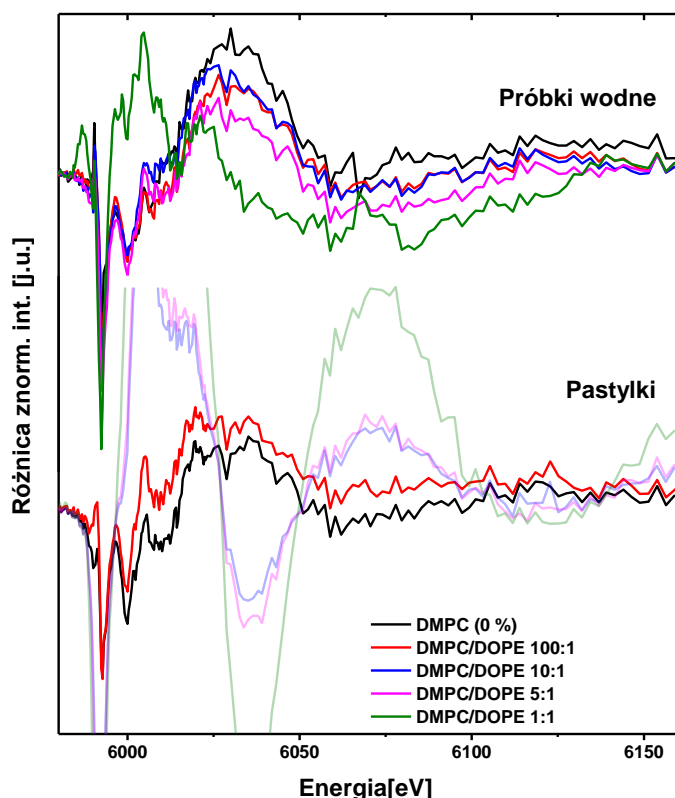
i DMPC:DOPE 1:1 + Cr do pozostałych widm liposomów. Obliczenia wykonano w programie Athena przy zablokowanej możliwości dopasowania parametrów E_0 oraz warunku wag większych od 0 i sumujących się do 1. Dopasowania zostały wykonane na I pochodnych widm XAS w zakresie od 5974,8 eV to 6064,8 eV. Analiza została przeprowadzona przy użyciu widm w formie I pochodnej, gdyż mniej zależą one od czynników zewnętrznych i problemów z normalizacją oraz wyraźniej eksponują różnice spektralne. Parametr R opisany wcześniej w Rozdziale V posłużył do oceny dopasowania. Wyniki analizy LCF znajdują się w Tabeli VII. 2 oraz na Rys. VII. 10. Na podstawie wyników dopasowania policzono także stosunek ilościowy [Cr(VI)]/[Cr(IV)]. Jak można zauważyć w przypadku próbek DMPC i DMPC:DOPE 100:1 wartości znacznie odbiegają od pozostałych próbek. Jeżeli zgonie z wynikami otrzymanymi z eksperymentu XRD przyjmie się, iż Cr(VI) osiadał na powierzchni liposomów, wówczas wyniki kombinacji liniowej, przy braku redukcji do Cr(IV), świadczyć mogą o intensywnej asocjacji chromu na powierzchni liposomów DMPC i DMPC:DOPE 100:1.

Protokół eksperymentalny dla próbek liposomowych w formie pastylek obejmował długie suszenie w temperaturze 55 °. Wydłużyło to znacznie czas oddziaływania Cr(VI) z błoną i przesunęło równowagę zakładanej reakcji $Cr(VI) + R \leftrightarrow Cr(IV) - R$ w stronę produktów (gdzie R oznacza dowolną resztę organiczną). W związku z tym powstało więcej produktów zawierających Cr(IV), jednakże w wyniku suszenia nie powinny powstać inne związki chemiczne niż w fazie wodnej. Aby zweryfikować tę hipotezę podczas tego samego eksperymentu wykonano pomiary XAS próbek wodnych w RT. Podobnie jak dla próbek w formie pastylek wykonano analizę LCF, której wyniki znajdują się w Tabeli VII. 3. Jak można zauważyć również w przypadku próbek wodnych zachodziła redukcja, jednakże w nieco inny sposób. Widmo DMPC wykazuje znacznie większą frakcję zredukowanej formy Cr niż w przypadku widm pastylek. Największą frakcją Cr(IV) spośród próbek wodnych zawiera widmo DMPC:DOPE 1:1 +Cr. Różnice pomiędzy wynikami dopasowań przedstawionymi w Tabelach VII. 2 i 3 wynikają z faktu, że próbki wodne nie były poddawane suszeniu. Podczas

Tabela VII. 3 Wyniki dopasowania liniowego widm XAS DMPC:DOPE 1:1 (pastylka) oraz $K_2Cr_2O_7$ do widm XAS próbek wodnych DMPC, DMPC:DOPE 100:1, DMPC:DOPE 10:1 oraz DMPC:DOPE 5:1.

Próbka z Cr	Referencja Cr		[Cr(VI)/Cr(IV)]	R
	$K_2Cr_2O_7$ (Cr(VI))	DMPC:DOPE 1:1 (Cr(IV))		
DMPC	0,899(19)	0,101(19)	8,901(1,863)	0,072
DMPC:DOPE 100:1	0,959(20)	0,041(20)	23,390(11,898)	0,075
DMPC:DOPE 10:1	0,969(21)	0,031(21)	31,258(21,852)	0,075
DMPC:DOPE 5:1	0,910(21)	0,090(21)	10,111(47)	0,094
DMPC:DOPE 1:1	0,786(25)	0,214(25)	3,673(546)	0,163

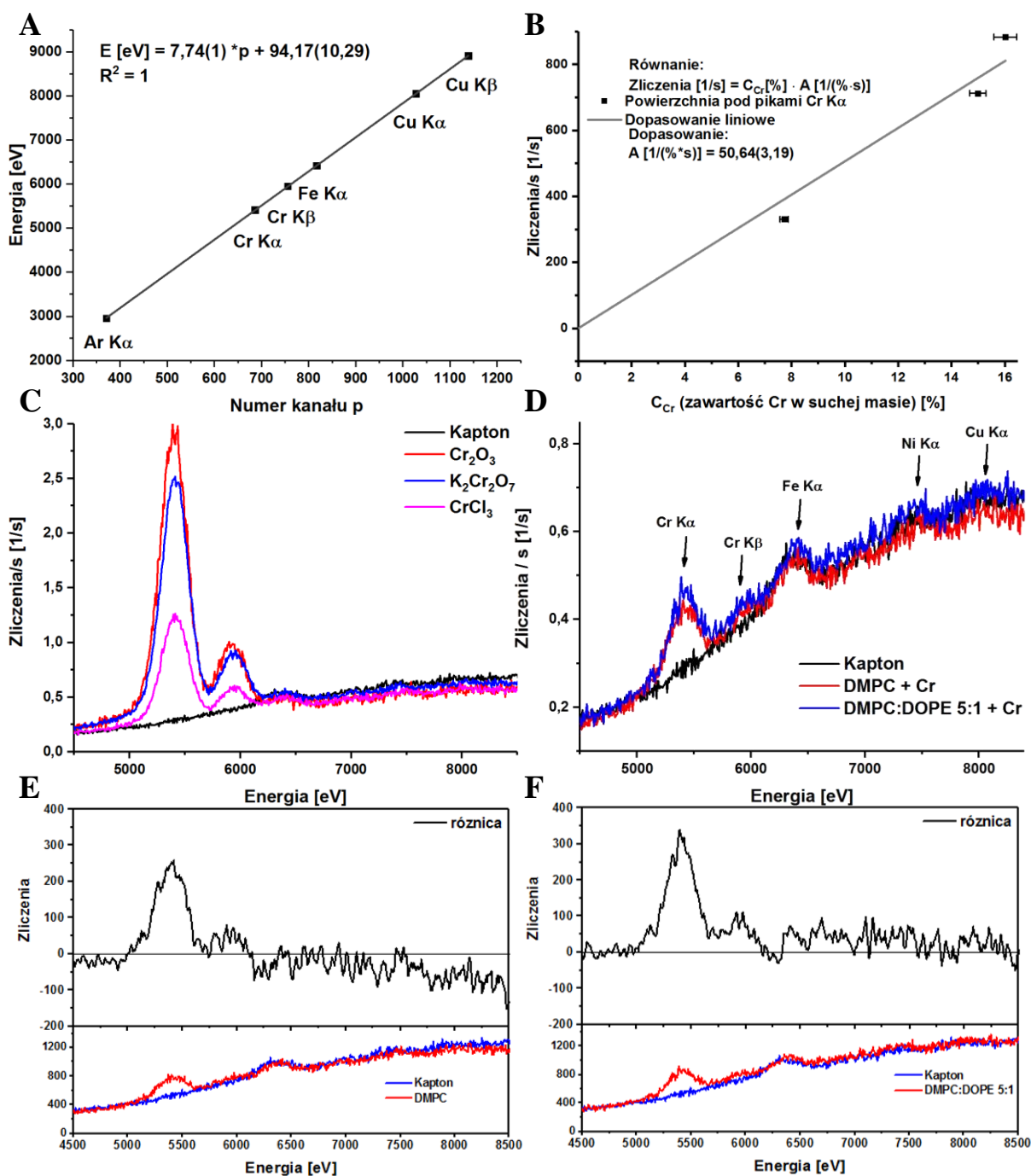
suszenia stężenie reagentów w roztworze rosło, co przesunęło równowagę reakcji redoks w kierunku produktów. W granicy niepewności nie ma różnic między trendami zmian w wynikach zawartych w Tabelach VII. 2 i 3. Należy jednak zaznaczyć, że wyniki dla próbek wodnych są obciążone ogromnymi niepewnościami, co bardzo wpływa na interpretację wyników. Dodatkowo widma zostały porównane jakościowo poprzez porównanie obliczonych widm różnicowych (liposomy + Cr) – $K_2Cr_2O_7$ w każdym typie próbek. Jak można zauważyć na Rys. VII 11 widma pastylek DMPC + Cr i DMPC:DOPE 100:1 +Cr wyglądają bardzo podobnie do widm próbek wodnych. Wyjątkiem od tej reguły jest widmo próbki wodnej



Rysunek VII. 11 Widma różnicowe XAS próbek wodnych (górną) i w formie pastylek. Intensywne widma pastylek zostały narysowane linią półprzezroczystą dla zachowania przejrzystości rysunku.

DMPC:DOPE 1:1 +Cr, które z kolei jest podobne do widm próbek wodnych DMPC:DOPE 10:1 +Cr i DMPC:DOPE 5:1 +Cr. Otrzymane widma różnicowe potwierdzają pierwotne założenie o tym, iż suszenie wydłużyło jedynie czas reakcji, natomiast nie przyczyniło się do powstania nowych typów produktów.

W celu ilościowego opisu procesu redukcji z Cr(VI) do Cr(IV) wykonano pomiary stężenia metodą XRF. Pozwoliło to na umieszczenie wyników kombinacji liniowej widm XAS na skali bezwzględnej ilości Cr związanego do błony lipidowej. Próbki w formie pastylek były



Rysunek VII. 12 Poszczególne etapy analizy widm XRF oraz przykładowe wyniki pomiarów: A – krzywa kalibracyjna energia – kanał; B – krzywa kalibracyjna zliczenia – stężenie; C – widma XRF próbek referencyjnych $K_2Cr_2O_7$, $CrCl_3 \cdot 5H_2O$, Cr_2O_3 ; D – przykładowe widma XRF dla: kaptonu DMPC + Cr oraz DMPC:DOPE 5:1 + Cr; E – widmo różnicowe DMPC – kapton (górze) i składowe widma (dół); F – widmo różnicowe DMPC:DOPE 5:1 – kapton (górze) i składowe widma (dół).

montowane na holderze pomiarowym za pomocą taśmy kaptonowej. Wykonano pomiary wszystkich próbek liposomowych zawierających Cr: DMPC, DMPC:DOPE 100:1, DMPC:DOPE 10:1, DMPC:DOPE 5:1, DMPC:DOPE 1:1, a ponadto referencji $K_2Cr_2O_7$, $CrCl_3$

$x 5H_2O$, Cr_2O_3 , $(C_6H_6)Cr(CO)_3$ oraz czystego kaptonu. Zakres pomiaru obejmował obszar od 1,6 keV do 15,5 keV. Ponadto, tło pochodzące od rozpraszania było bardzo wysokie. Aby zredukować wkład do widma XRF pochodzący od pierwiastków Fe, Cu, Ni znajdujących się w układzie pomiarowym, do ołowianego kolimatora dodano podwójne osłony Al-Pb. Jak można zauważyć na Rys. VII. 12 C, sygnał pochodzący od rozproszeń na układzie pomiarowym został skutecznie wytłumiony. Pozwoliło to na policzenie widm różnicowych i wyeksponowanie pików Cr $K\alpha$ i $K\beta$ przy energiach kolejno 5415 eV oraz 5947 eV. Wszystkie dane zostały znormalizowane poprzez podzielenie ich przez właściwy czas pomiaru detektora (ang. *Real time*). Energetyczna krzywa kalibracyjna na Rys. VII. 12 A została sporządzona na podstawie referencji o znanym stężeniu Cr: $K_2Cr_2O_7$, $CrCl_3 \times 5H_2O$, Cr_2O_3 . Wartości energetyczne do krzywej kalibracyjnej zaczerpnięto z programu Hephaestus [53]. Numery kanałów odpowiadające położeniom maksimum pików Ar, Fe, Cu odczytano z widma XRF czystego kaptonu zmierzonego bez osłon Al-Pb. Krzywa kalibracyjna pozwalająca przeliczyć powierzchnię pod pikiem Cr $K\alpha$ na stężenie Cr na Rys. VII. 12 B, została wyznaczona dzięki dokładnej znajomości stężeń Cr w próbkach referencyjnych. Widma użytych związków referencyjnych pokazane są na Rys. VII. 12 C. Dopasowanie liniowe punktów na Rys. VII. 12 B wykonano przy założeniu, że przy braku Cr w próbce nie ma sygnału na detektorze. Jest to założenie posiadania idealnego detektora, gdyż przy wyłączonej lampie rentgenowskiej, lub emitującej promieniowanie w innym zakresie pewne tło będzie zawsze obecne. Stąd widać na Rys. VII. 12 B odstępstwo dopasowania od punktów eksperymentalnych. Przykładowe widma XRF próbek DMPC +Cr, DMPC:DOPE 5:1 +Cr oraz kaptonu pokazane są na Rys. VII. 12 D. Jak można zauważyć, widmo kaptonu nie zawiera piku Cr $K\alpha$, ale posiada bardzo podobne do pozostałych widm tło. Aby dokładnie wyznaczyć stężenie Cr w próbkach liposomowych i pozbyć się wkładu do widm XRF od tła oraz śladów pików $K\alpha$ i $K\beta$ dla Ar, Fe, Cu i Ni, obliczono widma różnicowe. Różnice zostały wyliczone poprzez odjęcie od danego widma XRF wyniku pomiaru dla czystego kaptonu. Wykonując odejmowanie widm efektywnie zredukowano tło sygnału oraz wkład od pików Ar, Fe, Cu i Ni tak, jak pokazano dla przykładowych widm XRF DMPC i DMPC:DOPE 5:1 na Rys. VII. 12 E–F. Następnie, obszar pod pikiem Cr $K\alpha$ był całkowany, a powierzchnia pod nim była za pomocą krzywej kalibracyjnej z Rys. VII. 12 B przeliczana na jednostkę stężenia [%]. W ten sposób otrzymano wartości bezwzględne stężeń Cr we wszystkich próbkach liposomowych. Należy zaznaczyć, że były to dokładnie te same próbki, które zostały zmierzone wcześniej na stacji BM25-A.

Jak już wspomniano wcześniej, podczas eksperymentu XAS próbki liposomowe do pomiarów CRIO zostały przycięte. Oznacza to, że w trakcie pomiarów XRF nie zostały

zmierzone całe pastylki, ale ich fragmenty. Z kolei próbki referencyjne były mierzone tylko w RT i nie wymagały przycinania. Zatem krzywa kalibracyjna w eksperymencie XRF została wykonana na całych pastylkach i to wprowadzało błąd do obliczanych stężeń. Widać go na przykład na Rys. VII. 12. D. Na podstawie intensywności pików Cr K α w liposomach DMPC oraz DMPC:DOPE 5:1 +Cr można powiedzieć iż zawierają niemal identyczną zawartość chromu. Jest to oczywiście nieprawdą, gdyż liposomy w obu próbkach miały inną płynność błon lipidowych oraz różną ilość wiązań –HC=CH–, które stanowiły cel do redukcji Cr(VI). Aby wyeliminować ten błąd należało otrzymane stężenia Cr znormalizować do powierzchni całej pastylki. Dzięki temu, możliwe było połączenie wyników eksperymentów XAS i XRF.

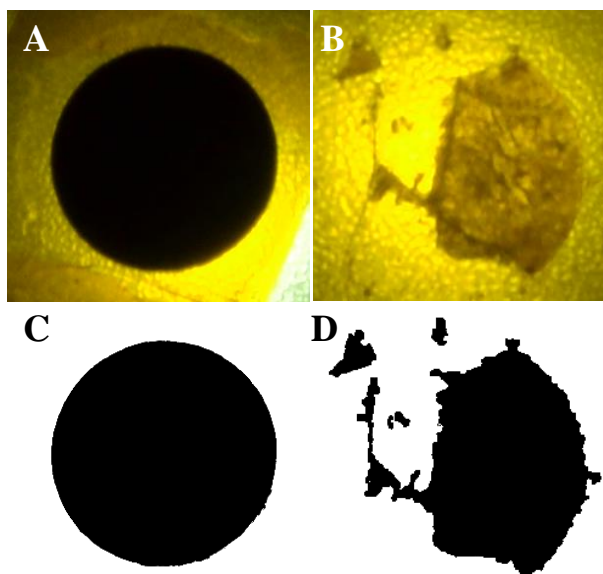
Renormalizacja wyników eksperymentu XRF została wykonana poprzez porównanie powierzchni pastylki referencyjnej Cr₂O₃ i próbek liposomowych. W tym celu, w wysokim kontraście i przy bardzo wysokiej rozdzielczości aparatem fotograficznym wykonano zdjęcia wymienionych próbek. Przykład dla pastylek Cr₂O₃ i DMPC:DOPE 100:1 +Cr pokazany jest na Rys. VII 13 A–B. W programie GIMP 2.8.16 (*Spencer Kimball, Peter Mattis and the GIMP Development Team*) obszary pastylki zakolorowano na czarno, a tło kaptonowe na białe, tworząc obraz binarny (Rys. VII 13 C–D). Następnie w programie ImageJ 1.49v (*Wayne Rasband, National Institute of Health, USA*) [196], przy użyciu opcji Analize -> Analize Particles obliczono powierzchnie pastylki Cr₂O₃ jak i próbek liposomowych. Współczynnik renormalizacyjny C_{corr} dla pastylek liposomowych otrzymano obliczając:

$$C_{corr} = 1 - \frac{A_{lip}}{A_{Cr_2O_3}} \quad (\text{VII. 1})$$

gdzie: A_{lip} – powierzchnia pastylki liposomowej;

$A_{Cr_2O_3}$ – powierzchnia pastylki Cr₂O₃.

Dla przykładu z Rys. VII 13 C–D współczynnik renormalizacji wyniósł 0,48(3). Należy zwrócić uwagę na fakt, że tego typu renormalizacja była możliwa tylko dzięki temu, że wszystkie pastylki wykonane na potrzeby eksperymentu miały identyczne parametry geometryczne. Ponadto, tego typu korekta nie uwzględnia zmiany grubości pastylek na krawędziach, jaka mogła wystąpić w wyniku cięcia próbek. Aby otrzymać tę informację należałoby wyznaczyć objętość próbek. Jednakże błąd C_{corr} wynikający z zastosowanej metody nie powinien być duży. Otrzymane poprawne wartości stężeń Cr w próbkach liposomowych można było następnie połączyć z wynikami kombinacji liniowej widm XAS zawartymi w Tabeli VII 2. Na Rys VII. 14 ponownie wyraźnie widać różnicę zaobserwowaną w eksperymencie XRD, na przykład na Rys. VII. 7. Próbki zawierające małą frakcję DOPE

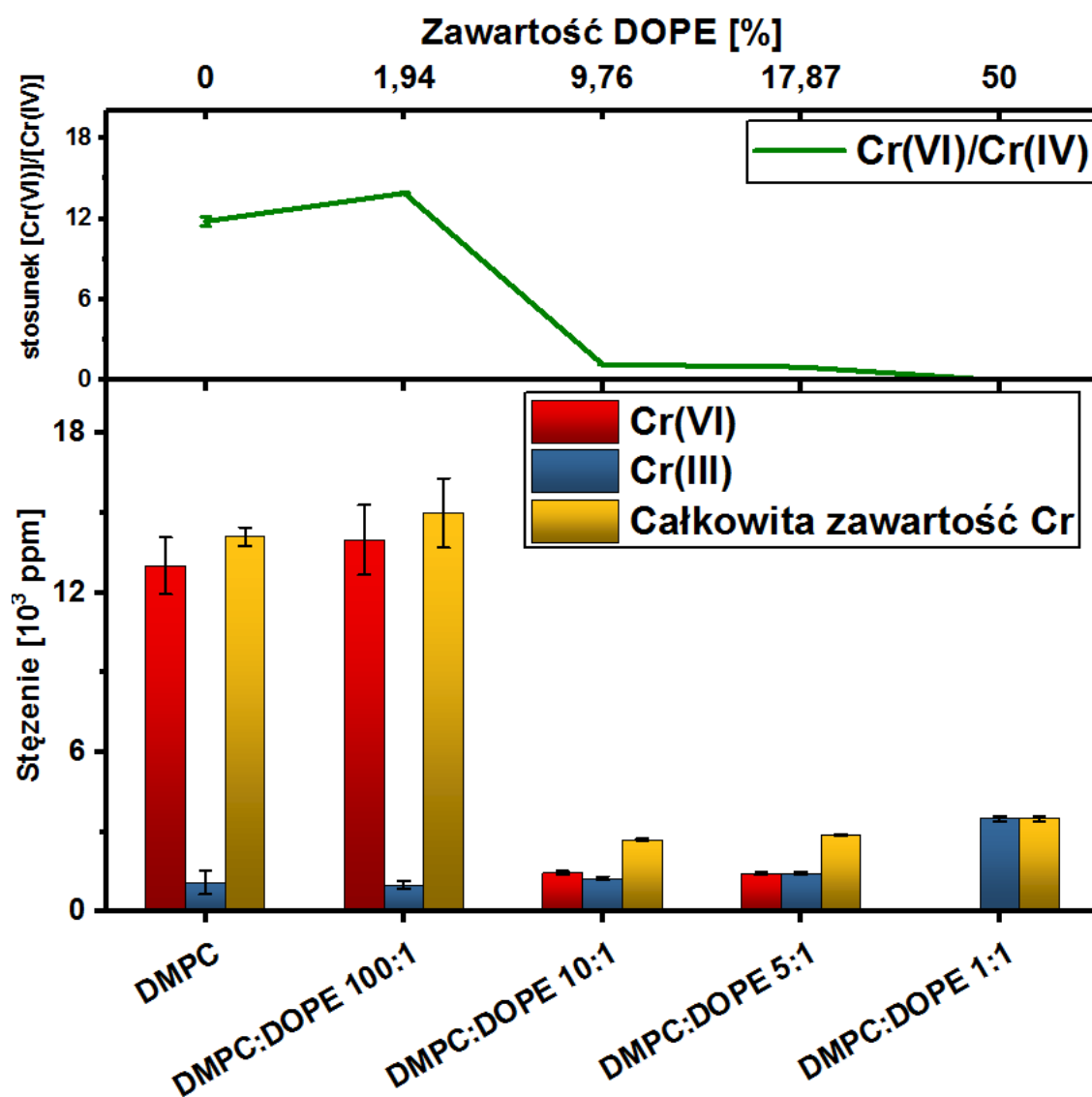


Rysunek VII. 13 Przykład zdjęć, które posłużyły do obliczenia współczynnika C_{corr} : A – zdjęcie pastylki Cr_2O_3 ; B – zdjęcie pastylki DMPC:DOPE 100:1 +Cr; C – obraz binarny pastylki Cr_2O_3 ; D – obraz binarny pastylki DMPC:DOPE 100:1 +Cr.

kształt widm XAS oraz widm różnicowych XAS (Rys. VII. 11). Jednocześnie duża zawartość Cr sugeruje, że Cr osadzał się efektywnie na powierzchni liposomów, a nie przenikał przez błony. Z kolei w próbkach o dużej zawartości DOPE zachodziła stopniowa redukcja Cr(VI) \rightarrow Cr(IV) wraz ze wzrostem stężenia DOPE w liposomach. Dużo mniejsza zawartość Cr sugeruje znacznie słabsze osadzanie się Cr(VI) na powierzchni błon. Równoczesny przyrost Cr(IV) oraz całkowitej ilości Cr przy jednoczesnym spadku zawartości Cr(VI) sugeruje trwale przywiązanie się chromu do błon lipidowych w wyniku redukcji Cr(VI) \rightarrow Cr(IV). Otrzymane wyniki i wnioski są podobne do wniosków wyciągniętych na bazie analizy podobnego eksperymentu dla błon *Pseudochrobactrum saccharolyticum* LY10, jednakże w tym eksperymencie postulowano końcowy stopień utleniania Cr na III i jako przyczynę redukcji Cr(VI) wskazano oddziaływanie z macierzą zewnątrzkomórkową wytworzoną na powierzchni błon komórkowych [186].

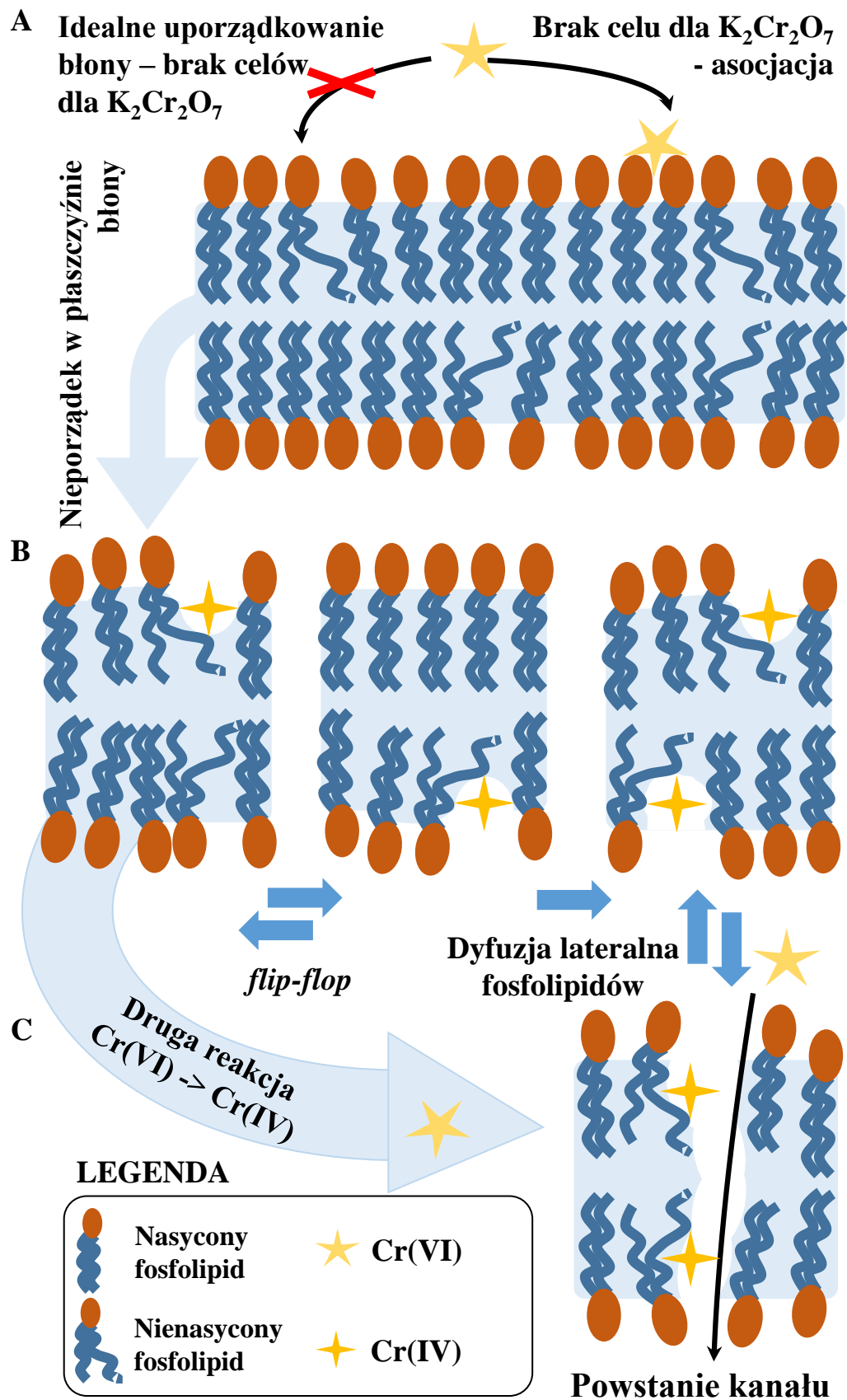
Chrom (VI) ma znacznie większą zdolność przenikania przez błony komórkowe niż Cr(III) dzięki mechanizmowi wymiany anionów [197]. Nieorganiczne aniony $Cr_2O_7^{2-}$ oraz CrO_4^{2-} w środowisku wodnym ulegają hydratacji i mają możliwość transportu pasywnego przez błonę lipidową. Skala tego procesu silnie zależy od grubości błony [198]. Dotychczasowy mechanizm pasywnego transportu przez błony zakłada, że dzięki stochastycznym ruchom cząsteczek w półpłynnej błonie, powstają krótko żyjące dziury w warstwie fosfolipidów [199].

mają inną zawartość Cr związanego w błonie i jest to w przeważającej większości Cr(VI). Liposomy z małą zawartością DOPE (DMPC +Cr i DMPC:DOPE 100:1 +Cr) różnią się mechanizmem oddziaływania z Cr(VI) i właściwościami fizycznymi od liposomów z dużą zawartością DOPE (DMPC:DOPE 10:1 +Cr, DMPC:DOPE 5:1 +Cr i DMPC:DOPE 1:1 +Cr). Były one mało płynne oraz miały za mało wiązań $-HC=CH-$, aby efektywnie zaszła redukcja z Cr(VI) do Cr(IV). W widmach XAS próbek DMPC +Cr i DMPC:DOPE 100:1 +Cr zarejestrowano Cr(IV) w podobnej ilości (w granicy niepewności), co sugeruje



Rysunek VII. 14 Połączone wyniki pomiarów XAS i XRF, obrazujące zmiany zawartości Cr(VI), Cr(IV) oraz całkowitego stężenia Cr w liposomach w funkcji ilości DOPE w błonach lipidowych.

W ten sposób wiele związków chemicznych jest transportowanych przez błony i żywe komórki zachowują równowagę elektrochemiczną [200]. Jednakże ten mechanizm nie preferowałby Cr(VI) ponad Cr(III), co również zostało zaobserwowane w przypadku transportu pasywnego. Należy podkreślić, że podczas przechodzenia przez błony lipidowe, Cr(VI) redukuje się w reakcji rodnikowej do niższego stopnia utlenienia, co wywołuje stres oksydacyjny i preoksydację (utlenianie) lipidów nienasyconych [177,201]. Ponadto zwiększa płynność błon [174,176]. Zaprezentowane w tym Rozdziale wyniki powiązały redukcję Cr(VI) \rightarrow Cr(IV) ze zwiększeniem nieuporządkowania błony oraz rosnącym stężeniem Cr trwale przywiązanego do błony lipidowej w funkcji ilości wiązań -HC=CH- w tej błonie. Na ich podstawie można zaproponować mechanizm oddziaływania Cr(VI) z błonami fosfolipidowymi, w którym wiązania -HC=CH- są celem ataku i utleniania przez Cr(VI). Omawiany mechanizm



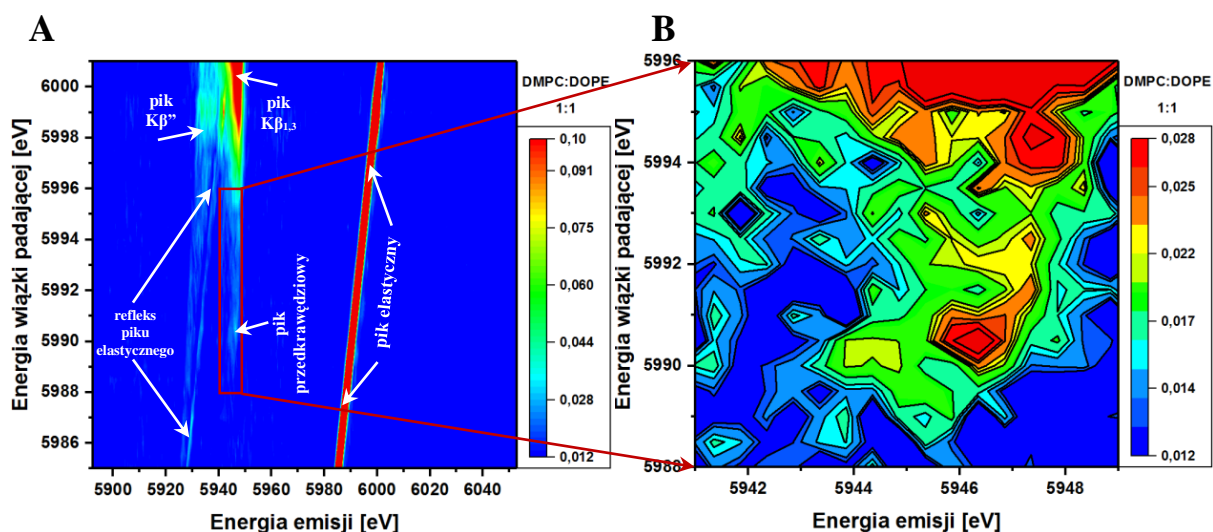
Rysunek VII. 15 Model oddziaływania $Cr(VI)$ z błoną. Przy braku ruchu wewnątrz błony $Cr(VI)$ nie może się zredukować. Gdy błona ma charakter półpłynny, wiązania $-HC=CH-$ mogą stać się celem utleniania przez $Cr(VI)$. Proces może się powtórzyć i doprowadzić do powstania kanału wodnego.

wykorzystuje znane zjawisko dyfuzji lateralnej fosfolipidów w monowarstwie lipidowej [202], które jest znacznie wyraźniejsze niż na przykład efekt *flip–flop*, czyli spontaniczna wymiana fosfolipidów zachodząca pomiędzy monowarstwami [203]. W błonie modelowej skala dyfuzji jest kontrolowana przez płynność błony. Proces przenikania Cr(VI) przez warstwy fosfolipidów może przebiegać w dwóch wariantach i prowadzi do stworzenia krótko żyjącego kanału wodnego (Rys. VII. 15). W przypadku braku własności półpłynnych i ruchu w błonie, reakcja redoks nie może zajść, gdyż nie ma potencjalnego celu utleniania. Cr(VI) może natomiast zasocjować na powierzchni błony (Rys. VII. 15 A). W przypadku uwzględnienia lateralnych oraz prostopadłych ruchów fosfolipidów, może dochodzić do spontanicznego i krótkiego wyeksponowania wiązań –HC=CH– . Stają się one wówczas celem do utleniania przez Cr(VI) (Rys. VII. 15 B). Sytuacja może się powtórzyć, jeżeli po obu stronach błony znajduje się fosfolipid z wiązaniem –HC=CH– , co doprowadzi do powstania krótko żyjącego kanału wodnego (Rys. VII. 15 C). Jeżeli nie ma drugiego fosfolipidu w pobliżu, wówczas w wyniku dyfuzji lateralnej fosfolipidów może dojść do przemieszania, które spowoduje, że powstanie układ dogodny do stworzenia kanału wodnego. Ponadto, należy również uwzględnić mechanizm *flip – flop*. W zależności od stopnia nienasycenia łańcuchów alifatycznych oraz stężenia Cr(VI) tworzenie kanałów będzie wydajne lub zatrzyma się na uszkodzeniu warstw błony, bez tworzenia kanałów (Rys. VII. 15 B). Zaproponowany mechanizm tłumaczy różnice w stopniu przenikalności Cr(VI) i Cr(III) przez błony lipidowe. Związki Cr(III) są bardzo stabilne i mają względnie niską potencjalną energię chemiczną. Największy potencjał redoks występuje dla reakcji $\text{Cr}^{3+} + \text{e}^- \leftrightarrow \text{Cr}^{2+}$ i jest równy -0.407 V [204]. Z kolei $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ i HCrO_4^{2-} mają potencjały redoks na poziomie 1.36 V i 1.35 V [204]. Oznacza to, że zgodnie z mechanizmem zaproponowanym na Rys. VII. 15 tylko związki chemiczne o dużym potencjale redoks mogą przechodzić przez błony lipidowe, wykorzystując swoją wysoką chemiczną energię potencjalną. Zaproponowany mechanizm tłumaczy także, dlaczego nie cały Cr(VI) ulega redukcji, co jasno wynika z Rys VII. 14. Po pierwsze, Cr(VI) asocjuje na błonach lipidowych. Po drugie, przenikając przez niestabilne kanały wodne, może się zdarzyć, że w wyniku dyfuzji lateralnej kanał się zamknie i Cr(VI) zostanie uwięziony pomiędzy monowarstwami fosfolipidów. Pomiedzy monowarstwami nie ma substratu do reakcji redoks, zatem Cr(VI) pozostanie w tej formie. Wówczas w wyniku dyfuzji lateralnej, ostatecznie Cr(VI) zostanie uwolniony do wnętrza liposomu. Ten element modelu należy jednak potwierdzić niezależnymi badaniami. Warto zaznaczyć, że opisany model wykorzystuje wszystkie cechy liposomów oraz tłumaczy wszystkie zaobserwowane zjawiska. Wadą zaprezentowanego rozwiązania jest brak interpretacji widma XAS próbki DMPC:DOPE 1:1

+ Cr, który wynika ze zbyt dużej ilości możliwych konfiguracji przyłączenia Cr do elementów błony lipidowej.

D. Pomiary RXES

Celem eksperymentu RXES było zidentyfikowanie ligandów przyłączonych do Cr w poszczególnych próbkach liposomowych oraz poznanie dokładnej lokalnej geometrii wokół Cr. Umożliwiłoby to zinterpretowanie teoretyczne widma XAS DMPC:DOPE 1:1 + Cr. Widma XANES okazały się niewystarczające do tego zadania, gdyż spektrum potencjalnych adduktów było zbyt duże. Uniemożliwiło to zbudowanie wiarygodnej struktury modelu, na bazie której wykonane zostałyby obliczenia *ab-initio*. Nawet widmo EXAFS, wobec braku wiedzy na temat struktury adduktu, było mało użyteczne. Ponadto EXAFS nie rozróżnia lekkich pierwiastków. Zatem w sytuacji, gdy powstanie organiczny addukt o strukturze na przykład R-O-CrO, R-Cr-(O₂K), R-CrO₂-CrO₂-K lub R-Cr(OK)-Cr=O (gdzie R oznacza grupę organiczną) i udałoby się zgadnąć skład ligandów, nie byłoby wiadomo, jakie są ich proporcje. Aby móc jednak otrzymać poszukiwane informacje, należało odpowiednio przygotować mapy RXES i wykonać odpowiednią ich analizę.

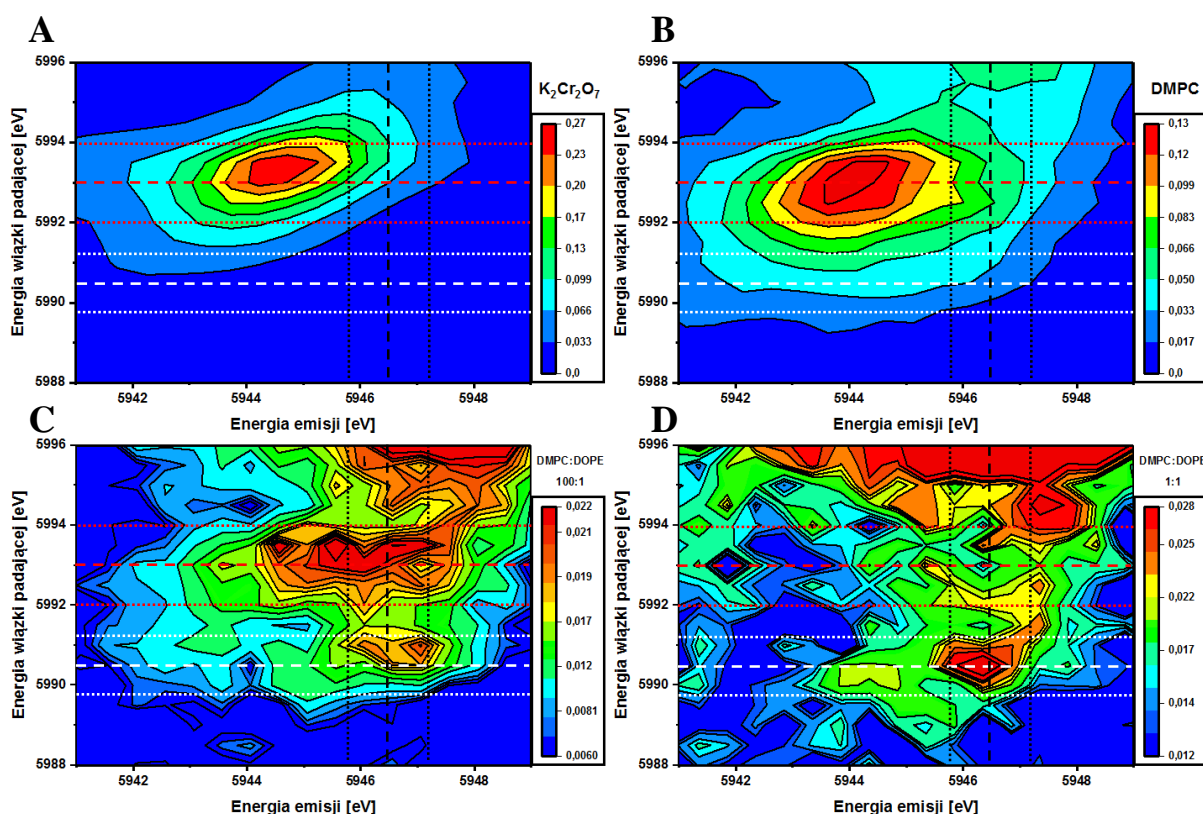


Rysunek VII. 16 Wycięcie rejonu piku przedkrawędziowego z map RXES na przykładzie mapy dla DMPC:DOPE 1:1 + Cr: A – pełna, mapa RXES z zaznaczonymi charakterystycznymi obszarami (kolor biały) oraz rejonem wycięcia piku przedkrawędziowego (czerwony kolor); B – wycięty rejon piku przedkrawędziowego. Refleks piku elastycznego jest widoczny w widmach XAS, jako tzw. „glitch”.

We wszystkich mapach RXES usunięto tło, podobnie jak wykonano to w przypadku map RXES związków żelaza w Rozdziale V. Następnie z każdej mapy RXES dokonano wycięcia obszaru przejścia 1s -> 3d tak, aby skala energetyczna map obejmowała zakres energii emisji 5941 eV – 5949 eV oraz energii padającej 5988 eV – 5996 eV. Przykład całej mapy

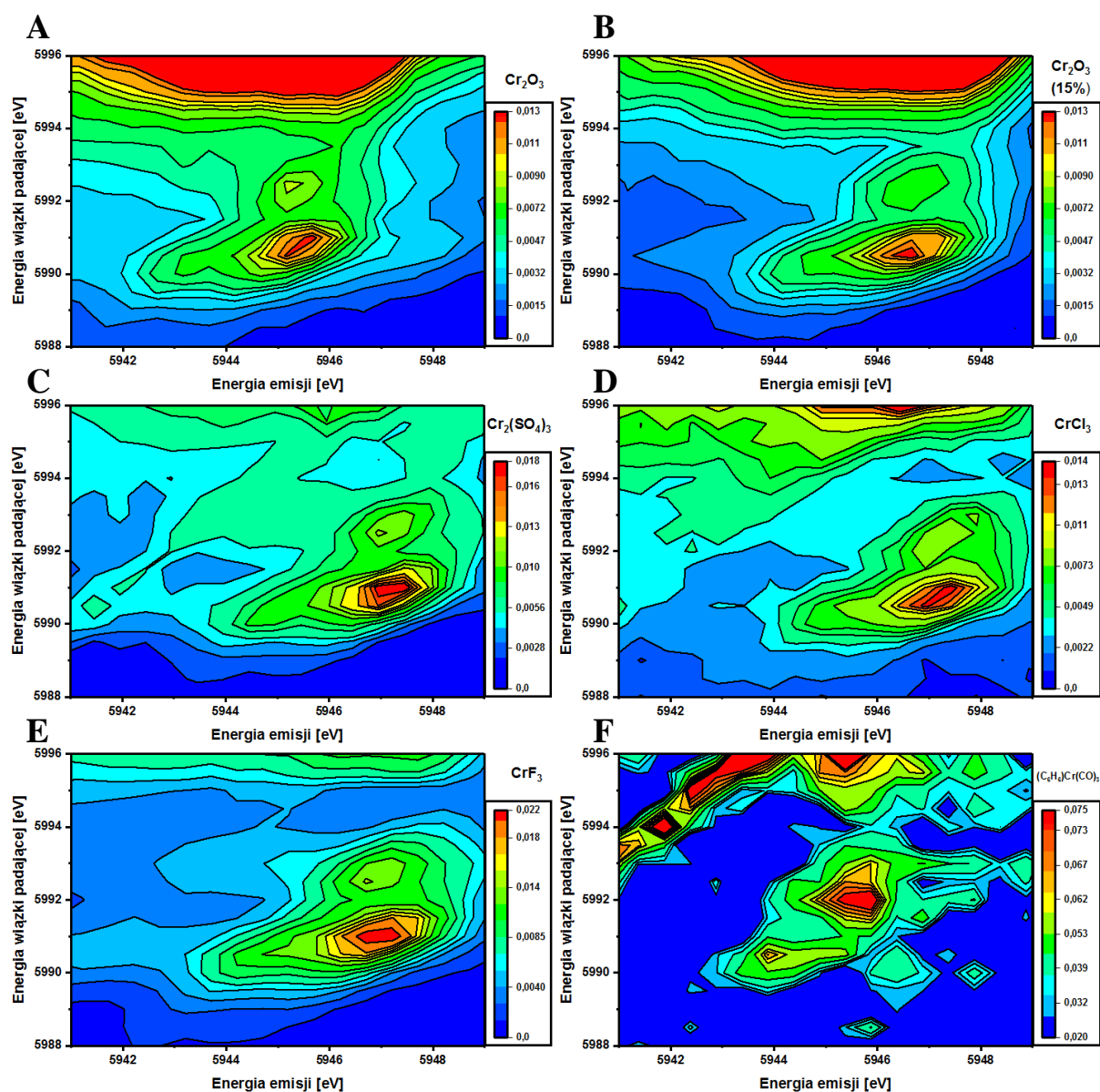
RXES dla próbki DMPC:DOPE 1:1 +Cr pokazany jest na Rys. VII. 16 A, podczas gdy wycięcie pokazane jest na Rys. VII. 16 B. Warto zwrócić uwagę na różnice skali intensywności pomiędzy pełną mapą RXES a wycięciem, które odzwierciedlają różnicę w intensywności wzbronionych, kwadrupolowych przejść elektronowych $1s \rightarrow 3d$ oraz dozwolonych, dipolowych przejść $1s \rightarrow 2p$.

Mapy RXES próbek liposomowych i $K_2Cr_2O_7$ zmierzonych w trakcie eksperymentu pokazane są na Rys VII. 17. Z powodu trudności technicznych, jakie wystąpiły podczas akwizycji danych, wykonano pomiar trzech z pięciu próbek i były to DMPC +Cr, DMPC:DOPE 10:1 +Cr oraz DMPC:DOPE 1:1 +Cr. Próbkę wybrano tak, aby pokryć cały zakres zmian stężenia DOPE. Mapy RXES próbek $K_2Cr_2O_7$ i DMPC są do siebie bardzo podobne. Charakteryzuje je jeden silny rezonans dla energii wiązki padającej 5992 – 5994 eV i energii emisji 5943 – 5946 eV. W obu przypadkach są to przejścia $1s \rightarrow 3d$ (struktura przedkrawędziowa) w $K_2Cr_2O_7$. Mapa RXES dla próbki DMPC:DOPE 1:1 +Cr wyraźnie pokazuje, że w tej próbce nie było już $K_2Cr_2O_7$, gdyż struktura przedkrawędziowa, charakterystyczna dla tego związku zanikła całkowicie. Pojawiły się natomiast maksima



Rysunek VII. 17 Mapy RXES w obszarze pików przedkrawędziowych dla próbek: A – $K_2Cr_2O_7$; B – DMPC +Cr; C – DMPC:DOPE 10:1 +Cr; D – DMPC:DOPE 1:1 +Cr. Linie przerywane o kolorach czerwonym, białym i czarnym oznaczają miejsca wycięć w mapach RXES przy energiach 5993 eV, 5990,5 eV oraz 5946,5 eV. Linie kropkowane w tych samych kolorach oznaczają zasięg wycięć.

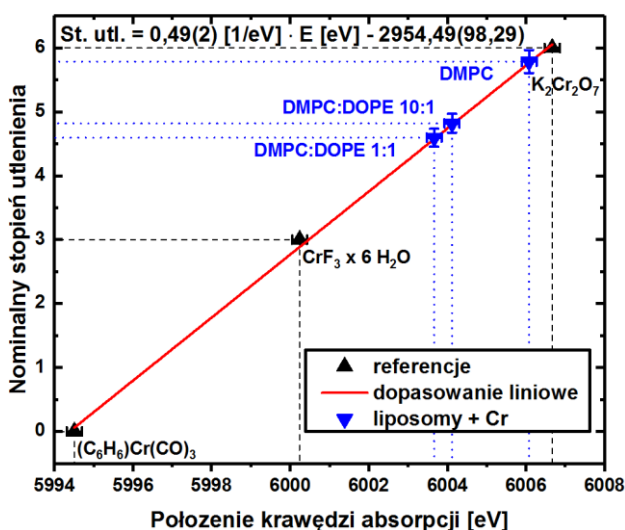
sygnału dla energii padającej równej 5990,5 eV i 5994,5 eV, które odpowiadały energiom emisji równym kolejno 5946,3 eV oraz 5947,7 eV. Jest to jednoznaczny dowód na postulowaną wcześniej całkowitą redukcję Cr(VI) w próbce DMPC:DOPE 1:1 +Cr, gdyż zmiany w strukturze przedkrawędziowej objawiają się całkowitym zanikiem intensywnego przejścia $1s \rightarrow 3d$ w $K_2Cr_2O_7$ kosztem nowego rezonansu. Ponadto, dla energii wiązki padającej 5995 eV – 5996 eV pojawiła się w całym zakresie energetycznym emisji widoczna krawędź absorpcji. Otrzymana mapa RXES stanowi potwierdzenie wyników z poprzednich widm XAS. Mapa RXES próbki DMPC:DOPE 10:1 +Cr wykazuje cechy pośrednie pomiędzy mapą RXES otrzymaną dla próbek DMPC +Cr i DMPC:DOPE 1:1 +Cr. W rejonie 5992-5994 eV energii wiązki padającej widać ślad intensywnego przejścia $1s \rightarrow 3d$ charakterystycznego dla $K_2Cr_2O_7$.



Rysunek VII. 18 Mapy RXES w obszarze pików przedkrawędziowych dla próbek referencyjnych: A – Cr_2O_3 ; B – Cr_2O_3 o stężeniu 15 %; C – $Cr_2(SO_4)_3$; D – $CrCl_3$; E – CrF_3 ; F – $(C_6H_6)Cr(CO)_3$.

Jednocześnie w rejonie 5990-5991 eV energii padającej pojawiła się struktura charakterystyczna dla niższego stopnia utlenienia Cr. Warto również zaznaczyć, że skale intensywności sygnału dla map z Rys. VII. 17, zostały dobrane tak, aby wyeksponować obecne w nich struktury. W efekcie skale map DMPC +Cr i DMPC:DOPE 100:1 +Cr są porównywalne między sobą i jednocześnie znacznie większe od zakresów map DMPC:DOPE 10:1 +Cr i DMPC:DOPE 1:1 +Cr, ze względu na obecność intensywnego pików pochodzącego od $K_2Cr_2O_7$.

Na Rys VII. 18 pokazane są mapy RXES obszaru przedkrawędziowego próbek referencyjnych. Rys. VII. 18 A-B przedstawiają mapy związku Cr_2O_3 w dwóch stężeniach, kolejno 100 % i 15 %. Jak można zauważyć są one do siebie bardzo podobne, z wyjątkiem różnic w intensywności. Na wszystkich mapach RXES związków na III stopniu utlenienia widać w obszarze 5990 – 5991 eV główny pik przedkrawędziowy. Ponadto można zaobserwować towarzyszący mu wyraźny rezonans przy energiach wiązki padającej 5991,5 – 5992,5 eV. Dodatkowo dla energii wiązki padającej głównego przejścia 1s -> 3d, ale w zakresie energii emisji 5943 – 5945,5 eV widać bardzo słabe przejście elektronowe. Widmo związku $(C_6H_6)Cr(CO)_3$ ma zupełnie inny układ przejść elektronowych co widać na Rys. 18 VII. F. W tym przypadku główne przejście w obszarze energii padającej 5990 – 5991 eV nie jest widoczne, natomiast pozostałe słabe przejścia są wyraźnie widoczne.

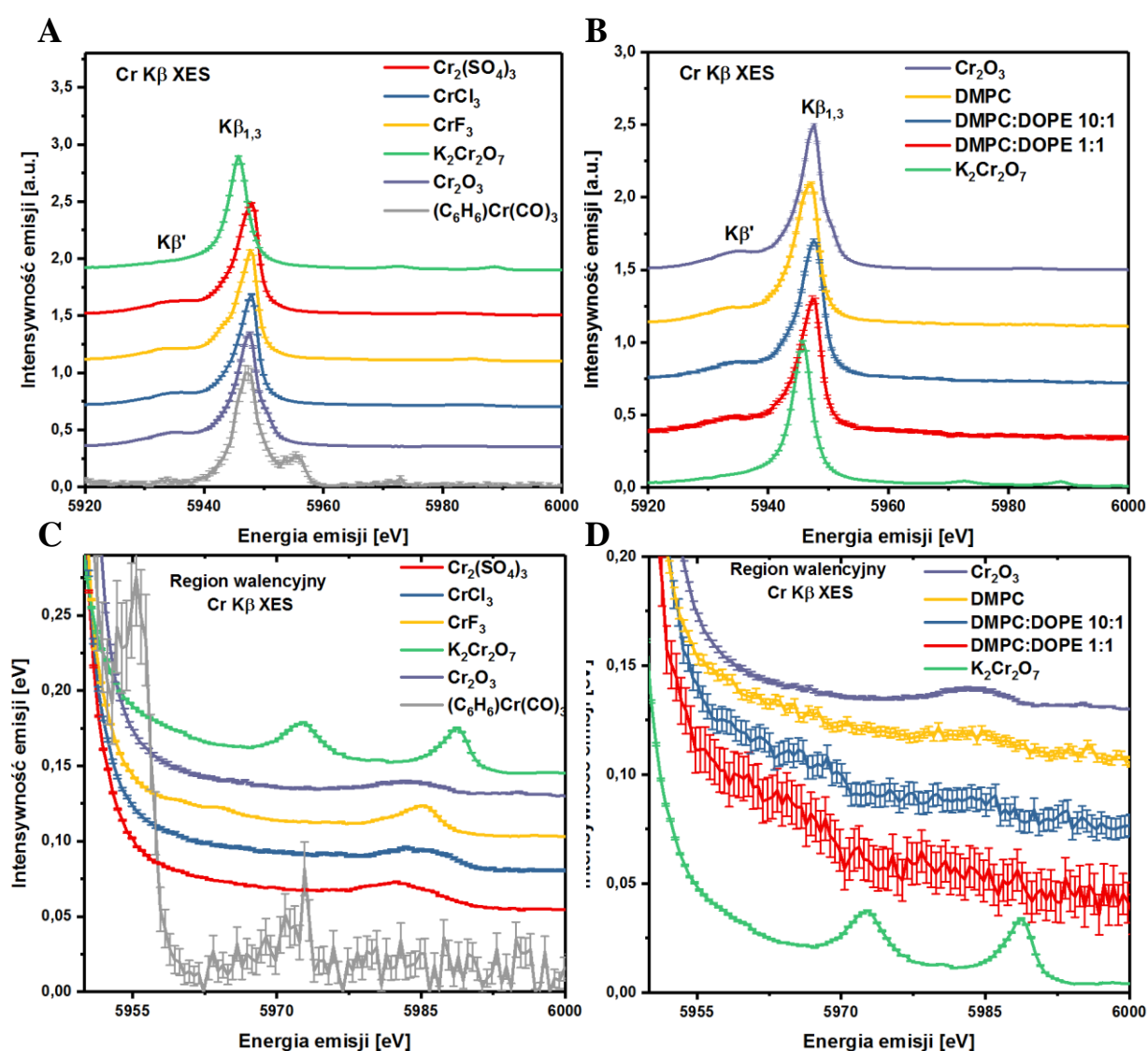


Rysunek VII. 19 Krzywa kalibracyjna położenie krawędzi – stopień utlenienia (kolor czerwony) oraz położenia krawędzi absorpcji w widmach liposomów (punkty koloru niebieskiego). Krzywa została sporządzona na podstawie widm XAS związków referencyjnych (punkty koloru czarnego).

Podczas eksperymentu w celu zweryfikowania kalibracji energetycznej widm i w celu określenia stopnia utlenienia Cr w próbkach liposomowych, przy pomocy detektora PIPS wykonano pomiary pełnych widm XAS wszystkich próbek. Pozwoliło to na ponowne wykonanie krzywej kalibracyjnej. Niestety, okazało się, że w rejonie przedkrawędziowym pojawiły się wąskie i intensywne piki, tzw. glitche. Przykład „glitcha” pokazany jest na Rys. VII. 16 A. Pochodziły one od niedoskonałości monochromatora, zatem nie można było efektywnie ich skorygować bez wpłynięcia na kształt widma. Uniemożliwiło to wykorzystanie widm XAS

w szerszy sposób, jednakże nadal można było wykonać krzywą kalibracyjną. Wynik pokazany jest na Rys. VII. 19. Jak można zauważyć, parametry krzywej otrzymane w eksperymencie na wiązce P64 w DESY są w granicy niepewności identyczne z tymi otrzymanymi na wiązce BM25-A w ESRF. Można więc przyjąć, iż kalibracja przebiegła poprawnie. Stopień utlenienia Cr w próbce DMPC +Cr wyniósł +5,8 natomiast w przypadku próbek DMPC:DOPE 10:1 +Cr oraz DMPC:DOPE 1:1 +Cr było to kolejno +4,9 i +4,6.

Pełne nierezonansowe widma emisyjne związków referencyjnych i próbek liposomów, otrzymane w pomiarze widm XES przy energii wiązki padającej 6200 eV, są pokazane na Rys. VII. 20 A-B, natomiast zbliżenia na obszar v2c pokazane są na Rys. VII.

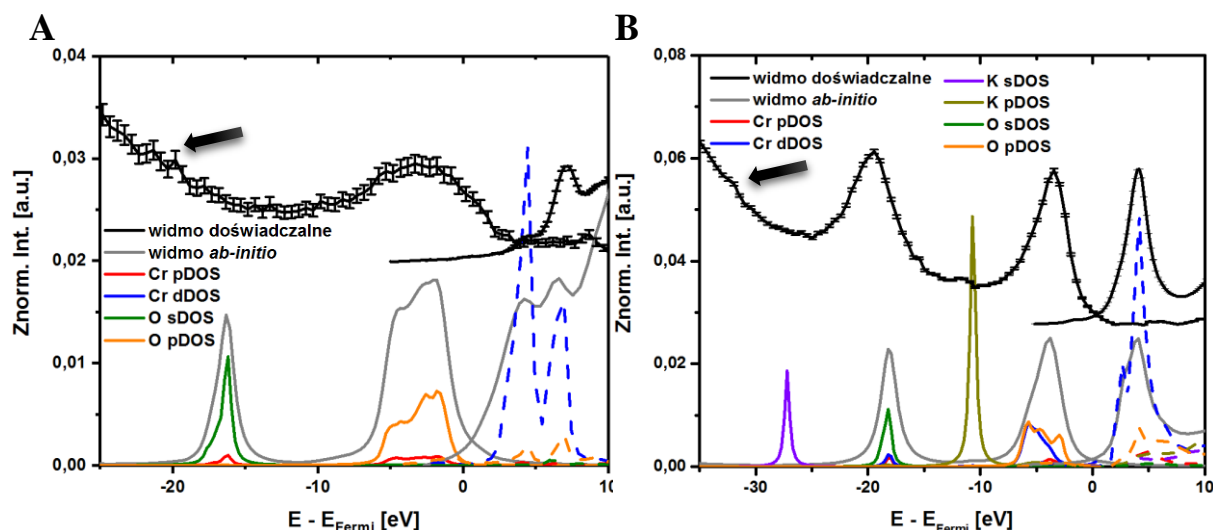


Rysunek VII. 20 Nierezonansowe widma XES wszystkich próbek: A – widma $K\beta$ XES związków referencyjnych; B – widma $K\beta$ XES próbek liposomów. Zmierzone próbki liposomów zostały zestawione z referencjami Cr_2O_3 (Cr(III)) oraz $K_2Cr_2O_7$ (Cr(VI)); C – zbliżenie na rejon v2c widm XES próbek referencyjnych; D – zbliżenie na rejon v2c widm XES próbek liposomów.

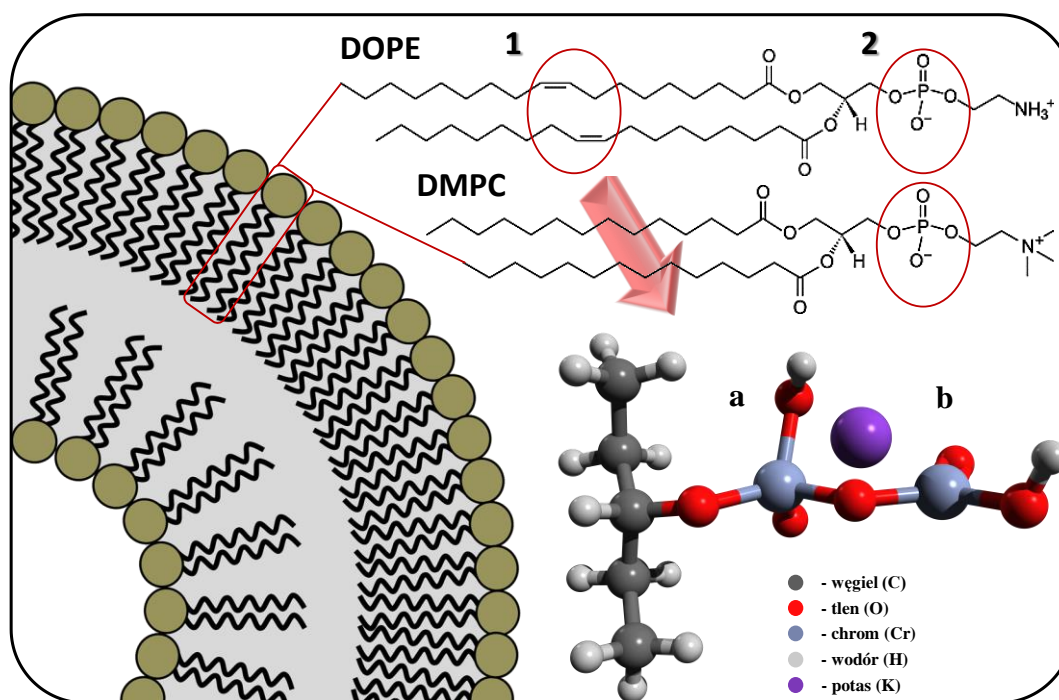
C-D. W widmach referencyjnych widać rosnącą zależność pomiędzy wzajemną odległością pików $K\beta_{1,3}$ i $K\beta_{2,5}$ w zależności od stopnia utleniania Cr w związku referencyjnym. Dla Cr^0 jest to 8,2(2) eV, podczas gdy dla Cr(III) w $Cr_2(SO_4)_3$, Cr_2O_3 , $CrCl_3 \times 6 H_2O$, CrF_3 jest to kolejno 34,5(2) eV 35,5(5) eV, 35,5(1) eV i 37,5(1) eV. W $K_2Cr_2O_7$, odległość ta wyniosła 43,0(1) eV. Dla widm XES próbek DMPC +Cr oraz DMPC:DOPE 10:1 +Cr, wartości te wyniosły kolejno 36,9(3,6) eV, 38,5(5,9) eV. Z kolei, w widmie DMPC:DOPE 1:1 +Cr, ze względu na bardzo zły stosunek sygnału do szumu, wartość ta pozostała nieokreślona. Można natomiast zauważyć, że pik $K\beta_{1,3}$ w widmie próbki DMPC:DOPE 1:1 +Cr ma maksimum w 5947,3(1) eV wobec 5947,6(1) eV i 5947,1(1) eV dla widm próbek DMPC:DOPE 10:1 +Cr oraz DMPC +Cr. Sugeruje to postępującą redukcję Cr w próbkach, gdyż są to podobne zmiany do zaobserwowanych w widmach $K\beta$ XES referencji. Struktura widoczna w widmie $(C_6H_6)Cr(CO)_3$ w zakresie energetycznym 5960 eV – 5973 eV, jest to pik elastyczny.

Kolejnym krokiem analizy było zidentyfikowanie pików występujących w widmach $K\beta$ XES Cr_2O_3 i $K_2Cr_2O_7$ oraz porównanie ich do pików obecnych w widmach XES próbek liposomowych. W szczególności pozwoliło to na przypisanie wkładu ligandów do widm $K\beta$ XES. Widma *ab-initio* policzone zostały w programie FEFF 9.6. W obu przypadkach wykorzystany został potencjał korelacyjno-wymienny Hedina-Lundqvista z tłem opisanym przez funkcję stanu podstawowego. Zasięg algorytmów FMS i SCF został ustawiony na 7,0 Å. W przypadku związku $K_2Cr_2O_7$ dziura rdzeniowa została opisana modelem RPA, podczas gdy dla Cr_2O_3 był to model FSR. Struktury obu referencji zostały pobrane z bazy WEBATOMS [90]. Porównanie obliczeń i eksperymentu w zakresie v_2c i przedkrawędziowym wraz z odpowiednimi funkcjami DOS zostały pokazane na Rys. VII. 21 A-B w funkcji odległości energetycznej od poziomu Fermiego. Elektronowe stany obsadzone i nieobsadzone zostały odróżnione przy użyciu funkcji (V.1). Jak można zauważyć, widma doświadczalne są znacznie bardziej poszerzone niż teoretyczne. Podobnie jak w przypadku pomiarów $K\beta$ RXES żelaza [89], dzieje się tak ze względu na konwolucję poszerzenia wakancji w stanie 1 s Cr (1,02 eV [205]) z poszerzeniem pochodzącym od układu pomiarowego (spektrometr, profil wiązki padającej) i w tym eksperymencie równym 1,03(1) eV. Poszerzenie eksperymentalne wyznaczone zostało poprzez dopasowanie funkcji Gaussa do pików elastycznych w widmach XES z zakresu „off-resonant”. W przypadku związku Cr_2O_3 w widmie emisyjnym zidentyfikowano w rejonie od 0 eV do – 10 eV przejścia $K\beta_{2,5}$ zdominowane przez elektronowe stany obsadzone typu p O z domieszką stanów typu d Cr [25,206,207]. Dodatkowo, że względu na obecność ligandu, przy energii -22 eV powinien znajdować się pik $K\beta$ pochodzący od tlenu.

Zostało to udowodnione zarówno obliczeniami DFT jak i eksperymentalnie [208]. Na Rys. VII. 21 A czarną strzałką oznaczono miejsce tego pików, jednakże jest on bardzo słabo widoczny. Dla widm v_{2c} XES wielu pierwiastków „ramię” pików $K\beta_{1,3}$ tworzy podwyższone tło w rejonie v_{2c} , które powoduje, iż pik $K\beta''$ jest niewidoczny [209–211]. Pik $K\beta_{2,5}$ został odtworzony przy energii -17 eV przez obliczenia FMS. Formalizm FMS zaczyna być obciążony coraz większą niepewnością im dalej od krawędzi absorpcji, a dla odległości około 20 eV od energii Fermiego ta różnica osiąga wartość ponad 1 eV i szybko rośnie [28,55]. Tłumaczy to różnicę 5 eV pomiędzy obliczonym położeniem pików $K\beta''$ na Rys. VII. 21, a zmierzoną wartością. Wyniki obliczeń należy zatem traktować jakościowo. Co warto zauważyć, pik $K\beta''$ jest zdominowany przez stany p tlenu [208]. Otrzymane wyniki są w pełni zgodne z wartościami literaturowymi otrzymanymi w pomiarach XPS [212]. Z kolei w części absorpcyjnej widma, odtworzone zostały główne elementy pików przedkrawędziowych. Warto zwrócić uwagę na fakt, że na maksima przy energiach 4 eV i 6 eV składają się stany nieobsadzone typu p O oraz typu d Cr. Wskazuje to na hybrydyzację orbitali tworzących wiązania chemiczne. Podobne wnioski można wyciągnąć w przypadku wyników dla $K_2Cr_2O_7$, widocznych na Rys. VII. 21 B. W widmie $K\beta$ XES dla $K_2Cr_2O_7$, na podstawie obliczeń *ab-initio* zidentyfikować można elektronowe przejścia dipolowe ze stanów O 2p oraz Cr 3p tworzące pik $K\beta_{2,5}$ w zakresie energii od 0 eV do -8 eV. Z kolei przy energii -19 eV znajduje się bardzo intensywny pik $K\beta''$ utworzony przez przejścia elektronowe O 2p -> Cr 1s. Oba te pików zostały z dobrą dokładnością (1 eV) odtworzone przez obliczenia FMS. Dodatkowo, w widmie eksperymentalnym można



Rysunek VII. 21 Nierezonansowe widma XES i XAS oraz widma *ab-initio* dla próbek: A – Cr_2O_3 (Cr(III)) oraz B – $K_2Cr_2O_7$ (Cr(VI)). Na obu rysunkach czarne strzałki wskazują elementy widma doświadczalnego, które nie zostały poprawnie zidentyfikowane przez algorytm FMS. Linia ciągła oznacza elektronowe stany obsadzone, natomiast linia przerywana oznacza stany nieobsadzone.



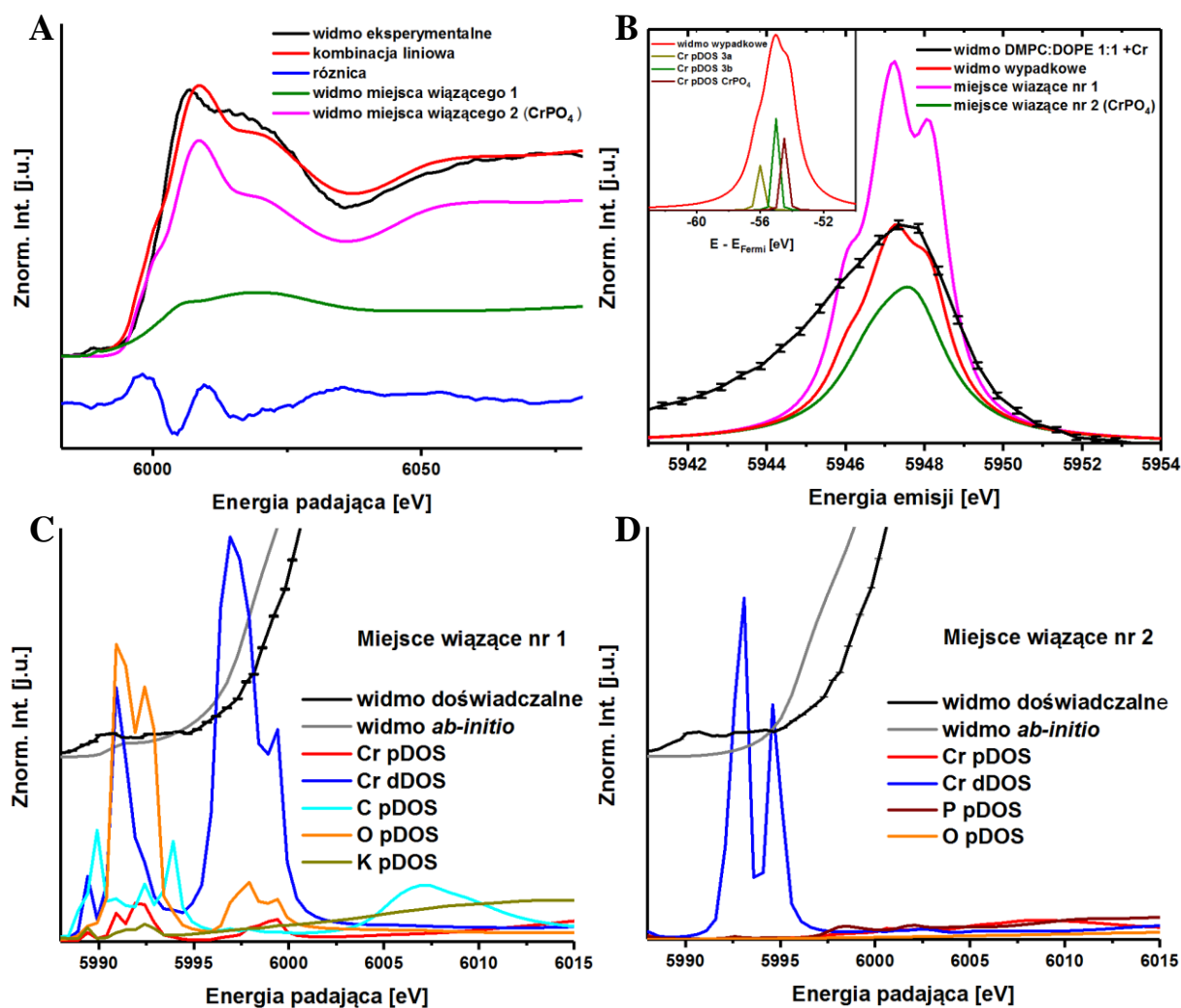
Rysunek VII. 22 Model wiązania Cr błonie lipidowej obejmujący trzy różne atomy Cr i dwa miejsca wiążące w łańcuchu alifatycznym fosfolipidów (1) oraz w części hydrofilowej fosfolipidów (2). Miejsce wiążące Cr w części alifatycznej zawiera dwa atomy Cr oznaczone a i b.

zaobserwować bardzo małe piki przy energiach -12 eV oraz -33 eV. Obliczenia FMS wskazują, że są to piki zdominowane przez wkłady od kolejno stanów K pDOS i K sDOS. Ze względu na fakt, iż jest to rejon walencyjny widma XES, można założyć, że są to wkłady od stanów K 3p i K 3s. Ponownie, otrzymane wyniki i wnioski są w pełni zgodne z pomiarami XPS [213]. Dodatkowo, widoczny wkład od stanów elektronowych potasu jest dowodem na wpływ II strefy koordynacyjnej na widmo rentgenowskie. Intensywny pik przedkrawędziowy w widmie związku $K_2Cr_2O_7$ jest w pełni zdominowany przez nieobsadzone stany elektronowe typu d Cr z domieszkami stanów p O, K oraz Cr. Jest to ponownie widoczny efekt zjawiska hybrydyzacji i dowód na to, że sól $K_2Cr_2O_7$ ma wiązania o charakterze mieszanym, a nie wyłącznie jonowym. Jak można zauważyć Rys. VII. 20 D, region walencyjny próbek liposomowych został zmierzony ze statystyką niewystarczającą do wykonania analizy podobnej do tej dla Cr_2O_3 i $K_2Cr_2O_7$. Jednakże dla próbki DMPC +Cr widmo v2c XES pozwala stwierdzić, że struktura widma v2c przy energiach od 5983 eV do 5987 eV jest podobna do Cr_2O_3 oraz, że przy energii 5968 eV może być obecny pik $K\beta''$ pochodzący od tlenu, bowiem dystans energetyczny pomiędzy pikiem $K\beta_{2,5}$, a strukturą identyfikowaną jako $K\beta''$, w obu przypadkach jest bardzo podobny (około 18 eV).

Wcześniej udowodniono, iż wszystkie widma XAS próbek liposomów DMPC +Cr, DMPC:DOPE 100:1 +Cr, DMPC:DOPE 10:1 +Cr i DMPC:DOPE 5:1 +Cr można odtworzyć przy pomocy kombinacji liniowej opartej na widmie DMPC:DOPE 1:1 +Cr i $K_2Cr_2O_7$ (Rys. VII. 10). Aby uzyskać pełną informację o postępującej redukcji Cr(VI) w wyniku oddziaływania z błonami lipidowymi potrzebna jest jeszcze interpretacja widma DMPC:DOPE 1:1 +Cr. Na podstawie otrzymanych w obecnie omawianym eksperymencie widm XES i XAS, zbudowano i zoptymalizowano szereg geometrii modelowych struktur oraz obliczono dla nich widma *ab-initio* w programie FEFF. Metodą eliminacji wybrano model wiązania Cr w błonie lipidowej, który użyty w obliczeniach FMS, odtwarza widma doświadczalne. Zoptymalizowana przy użyciu DFT struktura modelu, pokazana jest na Rys. VII. 22. Na zaproponowany model złożyły się dwa miejsca wiążące: 1) w miejscu wiązania $-HC=CH-$ oraz 2) w rejonie hydrofilowej błony, przy atomie P. Jak można zauważyć chrom jest obecny w formie Cr(IV), co zgadza się z wynikiem otrzymanym na podstawie krzywej kalibracyjnej (Rys. VII. 19) z dokładnością do 1/2 stopnia utlenienia. Dla zaprezentowanej struktury nr 1 na Rys. VII. 22 w programie FEFF obliczono widma XAS i XES. Do obliczeń wykorzystano potencjał korelacyjno-wymienny Hedina-Lundquista, z przesunięciem poziomu Fermiego o -3 eV, poszerzeniem widmowym równym 0 eV i funkcją stanu podstawowego użytą jako tło oddziaływania. Oddziaływanie wakancji rdzeniowej z fotoelektronem zostało opisane przy użyciu modelu RPA, natomiast algorytmy FMS i SCF miały zasięg 8,0 Å. Widma *ab-initio* oraz funkcje DOS zostały osobno obliczone dla obu atomów Cr w modelu, przesunięte o wartości podane przez program do relatywnej skali energetycznej względem poziomu Fermiego, a następnie wyznaczono kombinację liniową tych widm w stosunku 1:1. Dla miejsca wiążącego nr 2 widmo *ab-initio* oraz funkcje DOS, z takimi samymi parametrami jakie zostały użyte do obliczeń miejsca wiążącego nr 1, zostały wyznaczone w oparciu o strukturę krystalograficzną $CrPO_4$ z bazy Materials Project [214] (ID: mp-19401). Następnie, dokonano kombinacji liniowej widm XAS i funkcji DOS reprezentujących miejsca wiążące nr 1 i 2. Kombinacja liniowa obejmowała obszar od 5984 eV do 6054 eV. Ze względu na możliwe rozbitcie cząsteczki $K_2Cr_2O_7$ podczas redukcji z Cr(VI), warunek sumy wag równej 1 nie był wymagany. Ponadto, widma *ab-initio* w programie FEFF mają wyznaczoną energię Fermiego z dokładnością do 3 eV, więc parametr E_0 również był dopasowywany. Wyniki analizy zostały zaprezentowane na Rys. VII. 23 A. Wartość parametru R wyniosła 0,0195 podczas gdy $\chi^2 = 0,591$. Widma miejsca wiążącego nr 1 ($CrPO_4$) i 2 zostały dopasowane z wagami kolejno 0,766(41) i 0,286(42) oraz wartościami E_0 równymi 0,203(206) eV i -5,633(945) eV. Otrzymany model odtworzył wszystkie elementy widma doświadczalnego, jednakże zawierał

także odstępstwa od niego, zwłaszcza w obszarze od 5995 eV do 6015 eV. Można to zaobserwować w widmie różnicowym na Rys. VII. 23 A.

Widma v2c XES są najlepszym źródłem informacji na temat ligandów przyłączonych do absorbera. W przypadku próbek liposomowych mają one jednak bardzo małą statystykę i trudno byłoby tylko na ich podstawie zweryfikować model wiązania Cr. Jednakże ze względu na fakt, iż linie $K\beta_{1,3}$ również są czułe na zmiany w otoczeniu chemicznym metali 3d gdyż są to przejścia $1s \rightarrow 3d$ [24,26], można je wykorzystać do identyfikacji otoczenia chemicznego

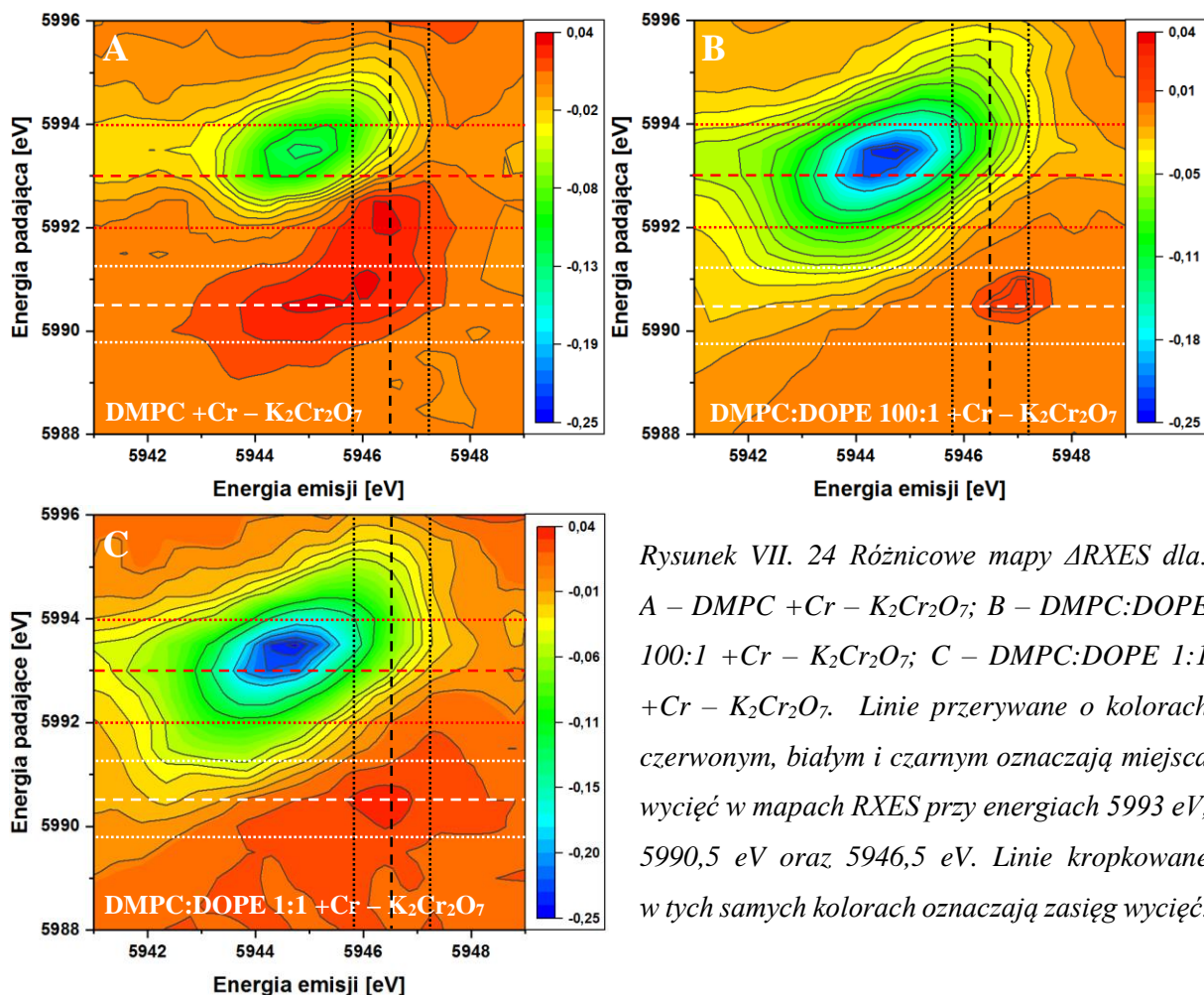


Rysunek VII. 23 A – Porównanie widm XAS eksperymentalnego i otrzymanego w kombinacji liniowej oraz widm *ab-initio* obu miejsc wiążących Cr z Rys. VII. 21; B – Porównanie widm kombinacji liniowej widm *ab-initio* obszaru $K\beta_{1,3}$ wykonanej według wag kombinacji liniowej z rysunku A i wyniku doświadczalnego. Widmo miejsca wiążącego nr 1 otrzymano obliczając widma XAS atomów **a** i **b**, a następnie łącząc wyniki w stosunku 1:1. Inset przedstawia funkcje DOS typu p odpowiadające poszczególnym pikom widocznym na wypadkowym widmie. C – widmo *ab-initio* XAS miejsca wiążącego Cr nr 1 wraz z istotnymi funkcjami DOS; D – widmo *ab-initio* XAS miejsca wiążącego Cr nr 2 wraz z funkcjami DOS mającymi znaczny wkład do widma.

Cr. Dodatkowo, na mapie XES obszar linii $K\beta_{1,3}$ jest w konwolucji z sygnałem pochodzącym od pików przedkrawędziowych (odpowiadają za niego przejścia elektronowe $1s \rightarrow 3d$), który zawiera informacje o lokalnej geometrii i rodzaju ligandów wokół metalu 3d. Zgodnie z modelem założonym na podstawie struktury z Rys. VII. 22 obliczono w programie FEFF widmo XES z obszaru spektralnego pików $K\beta_{1,3}$ oraz wykonano kombinację liniową pików pochodzących od miejsc wiążących nr 1 i 2. Do wyznaczenia widma wypadkowego użyto wag otrzymanych w kombinacji liniowej Rys. VII. 23 A. Widmo $K\beta_{1,3}$ miejsca wiążącego nr 1 obliczono, łącząc widma atomów **a** i **b** z Rys. VII. 22 w stosunku 1:1, a obliczenia *ab-initio* wykonano z takimi samymi parametrami jakich użyto do wyznaczenia widm XAS tych struktur. Jak można zauważyć na Rys. VII. 23 B, właściwe widmo $K\beta_{1,3}$ XES składa się z trzech maksimum przy energiach -54,4 eV, -55,1 eV oraz -56,2 eV i składają się na nie wyłącznie gęstości stanów typu p. Należy zaznaczyć, że algorytm FMS oblicza widma *ab-initio* w stanie podstawowym [60] i nie ma możliwości wyznaczenia linii $K\beta'$. Będzie to rzutowało na porównanie wyników teoretycznych z eksperymentem oraz na dalsze obliczenia.

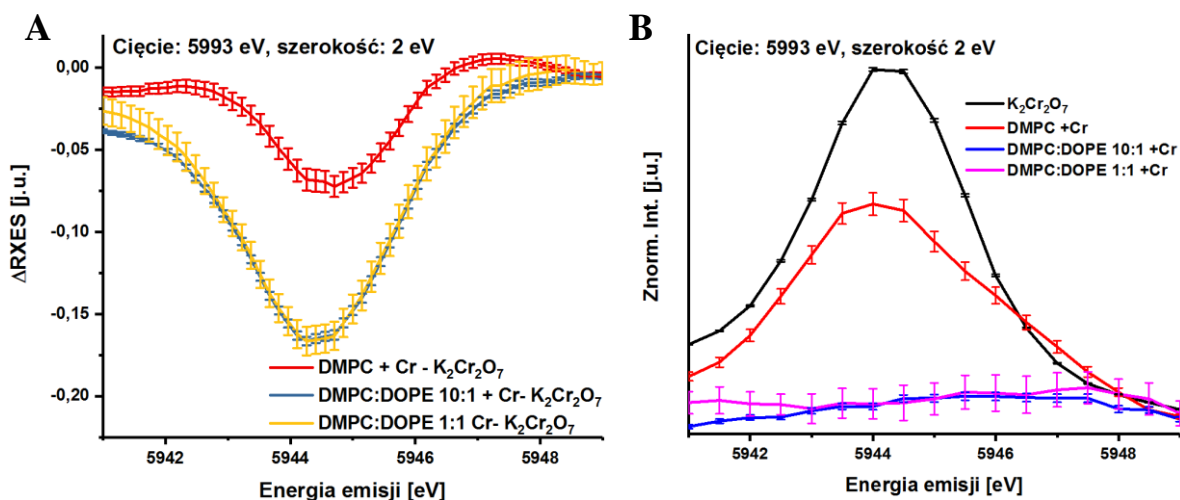
Na Rys. VII. 23 C-D, pokazane są szczegółowe wyniki obliczeń *ab-initio* widm XAS i odpowiadającym im funkcjom DOS obu miejsc wiążących Cr w modelu z Rys. VII. 22. Model 1 zawiera widoczny pik przedkrawędziowy w obszarze widma od 5989,6 eV do 5994,5 eV i jest to jedyny wkład do pików przedkrawędziowych w kombinacji liniowej. Warto zauważyć, że według obliczonych na Rys. VII. 23 C funkcji DOS, na pik przedkrawędziowy składają się nałożone stany 2p Cr na stany 3d Cr (szczególnie przy energiach 5989,6 eV, 5992,4 eV i 5993,9 eV) oraz stany 2p O na stany 3d Cr (szczególnie przy energiach 5990,9 eV i 5992,4 eV). Dodatkowo w obszarze od 5995 eV do 6000 eV również mieszają się stany Cr dDOS i O pDOS, jednakże efekt tego mieszania jest słabo widoczny zarówno w widmie doświadczalnym jak i *ab-initio*, ze względu na rosnącą krawędź absorpcji. Warto zauważyć, że w modelu 2 widocznym na Rys. VII. 23 D, który odpowiada wiązaniu jonowemu, nie ma hybrydyzacji stanów d Cr i p ligandów. Co za tym idzie, pomimo obecności dwóch wyraźnych maksimum funkcji Cr dDOS przy energiach 5993,1 eV i 5994,6 eV, nie ma możliwości by zachodziły przejścia $1s \rightarrow 3d$ i pik przedkrawędziowy jest niewidoczny.

W celu wyznaczenia z widm $K\beta$ XES subtelnych różnic informujących o zmianie otoczenia chemicznego Cr obliczono mapy różnicowe Δ RXES pomiędzy próbkami DMPC + Cr i $K_2Cr_2O_7$, DMPC:DOPE 100:1 + Cr i $K_2Cr_2O_7$ oraz DMPC:DOPE 1:1 + Cr i $K_2Cr_2O_7$. Przeskalowane do tego samego zakresu intensywności mapy Δ RXES pokazane są na Rys. VII. 24. We wszystkich mapach widać silnie ujemny obszar, który odpowiada pikowi przedkrawędziowemu charakterystycznemu dla $K_2Cr_2O_7$. Warto zwrócić uwagę na fakt,



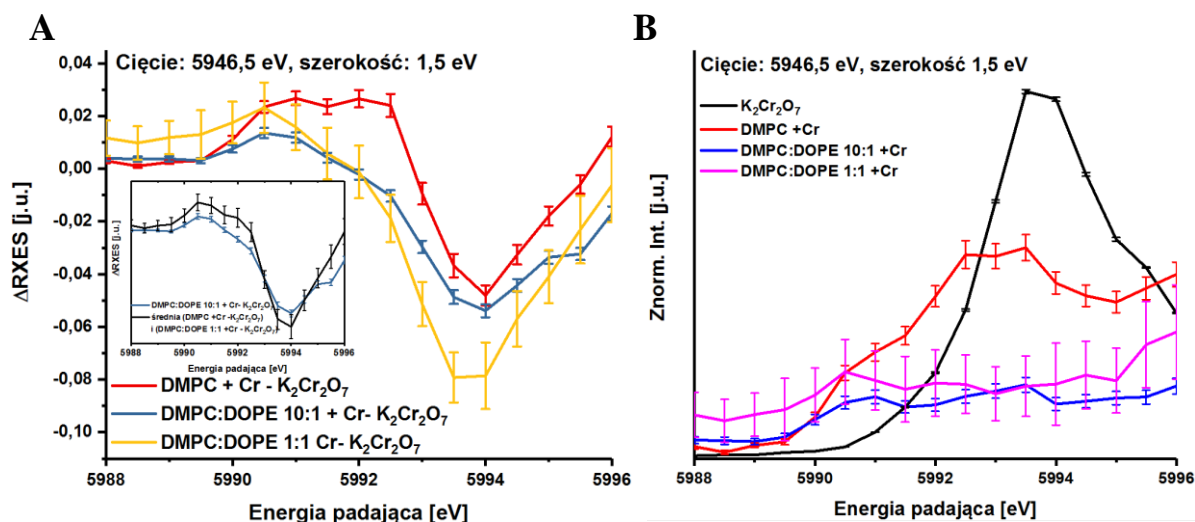
Rysunek VII. 24 Różnicowe mapy Δ RXES dla: A – DMPC + Cr – $K_2Cr_2O_7$; B – DMPC:DOPE 100:1 + Cr – $K_2Cr_2O_7$; C – DMPC:DOPE 1:1 + Cr – $K_2Cr_2O_7$. Linie przerywane o kolorach czerwonym, białym i czarnym oznaczają miejsca wycięć w mapach RXES przy energiach 5993 eV, 5990,5 eV oraz 5946,5 eV. Linie kropkowane w tych samych kolorach oznaczają zasięg wycięć.

że intensywność różnicy w obszarze pików przedkrawędziowych maleje wraz ze wzrostem ilości DOPE w próbkach, co jest zgodne z wynikami kombinacji liniowej widm XAS z Rys. VII. 10 i Tabeli VII. 2. Lepiej można zaobserwować te zmiany robiąc wycięcie w mapie RXES wzdłuż energii emisji, w obszarze przejścia elektronowego $1s \rightarrow 3d$ w $K_2Cr_2O_7$. Oznacza to scałkowanie mapy RXES w małym obszarze energii padającej i w całym rozpatrywanym zakresie energii emisji. Na Rys. VII. 25 A pokazane zostały wycięcia z map Δ RXES widocznych na Rys. VII. 24 A-C, o szerokości 2 eV wykonane dla energii wiązki padającej 5993 eV. Jak widać dla mapy DMPC + Cr – $K_2Cr_2O_7$, minimum przy energii 5944,5 eV ma największą wartość, co zgadza się z wnioskami na temat zmian ilości $K_2Cr_2O_7$ w próbkach, które zostały wyciągnięte wcześniej. Ponadto, na Rys. VII. 25 B pokazane są wycięcia z pełnych map RXES dla energii wiązki padającej 5993 eV, które przedstawiają wycięcia, których różnice przedstawia Rys. VII. 25 A. W obrębie niepewności pomiarowej nie widać natomiast różnic pomiędzy cięciami otrzymanymi z map Δ RXES DMPC:DOPE 100:1 + Cr – $K_2Cr_2O_7$ oraz DMPC:DOPE 1:1 + Cr – $K_2Cr_2O_7$. Oznacza to, że na etapie przygotowywania próbek, ich dializa przebiegła poprawnie i cały niezwiązany $K_2Cr_2O_7$ został usunięty. Rys. VII.



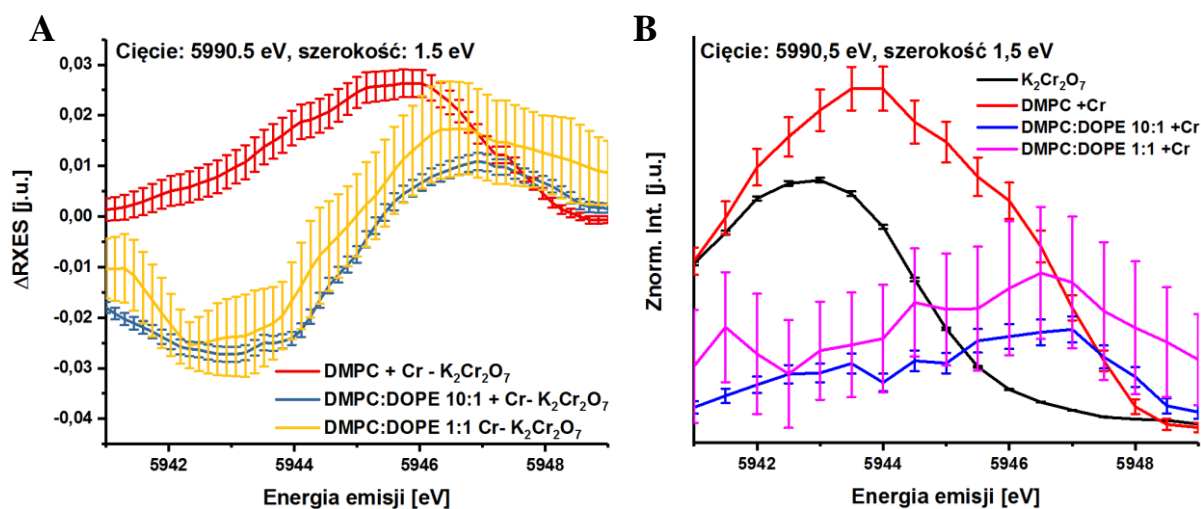
Rysunek VII. 25 Wycięcia z map: A – Δ RXES wykonane wzdłuż energii emisji, szerokość wycięcia 2 eV dla energii padającej równej 5993 eV; B – RXES wykonane wzdłuż energii emisji, szerokość wycięcia 2 eV dla energii padającej równej 5993 eV.

26 A przedstawia wycięcia dokonane z map różnicowych Δ RXES wzdłuż energii wiązki padającej, o szerokości 1,5 eV i wykonane dla energii emisji równej 5946,5 eV. Jak widać, wszystkie profile mają podobny przebieg, ale występują różnice wokół minimum przy energii 5994 eV. Ponadto, profil DMPC +Cr - $K_2Cr_2O_7$ różni się od pozostałych dwóch w wyraźnym maksimum przy energii 5992 eV. Jest to energia granicząca z intensywnym pikiem przedkrawędziowym występującym w widmach XAS zarówno $K_2Cr_2O_7$ jak i DMPC +Cr. W próbce DMPC +Cr może wystąpić tylko jedno z miejsc wiązających opisanych w modelu z Rys. VII. 22, w którym Cr przyłącza się do grupy fosforanowej, gdyż próbka nie zawierała wiązań $-HC=CH-$. Jak można zauważyć, na widmie *ab-initio* tego modelu na Rys. VII. 23 D występuje maksimum funkcji Cr dDOS przy energii 5993,1 eV, jednakże ten pik jest bardzo szeroki i gęstość stanów jest widoczna nawet przy wartościach 5991,6 eV. Można zatem przypuszczać, że wbrew wnioskowi wyciągniętemu na podstawie samego widma *ab-initio* $CrPO_4$ i doświadczalnego XAS, stany O 2p i Cr 3d w niewielkim stopniu hybrydują i umożliwiają zachodzenie przejść $1s \rightarrow 3d$. Wniosek ten pokazuje przewagę eksperymentu RXES nad pomiarami XAS. Insert Rys. VII. 26 A przedstawia widmo DMPC:DOPE 10:1 +Cr - $K_2Cr_2O_7$ porównane do średniego widma policzonego przy użyciu widm DMPC +Cr - $K_2Cr_2O_7$ i DMPC:DOPE 10:1 +Cr - $K_2Cr_2O_7$. Jak widać, w granicy niepewności oba widma są takie same, z wyjątkiem obszaru wokół energii 5992 eV, w którym jednak różnica w intensywności sygnału przy energii 5992 eV zmalała. Świadczy to o tym, że zmiany zaobserwowane w widmach próbek liposomowych miały charakter stopniowy – redukcja Cr(VI) rzeczywiście postępowała. Rys. VII. 26 B przedstawia wycięcia z map RXES wykonane dla tej samej energii



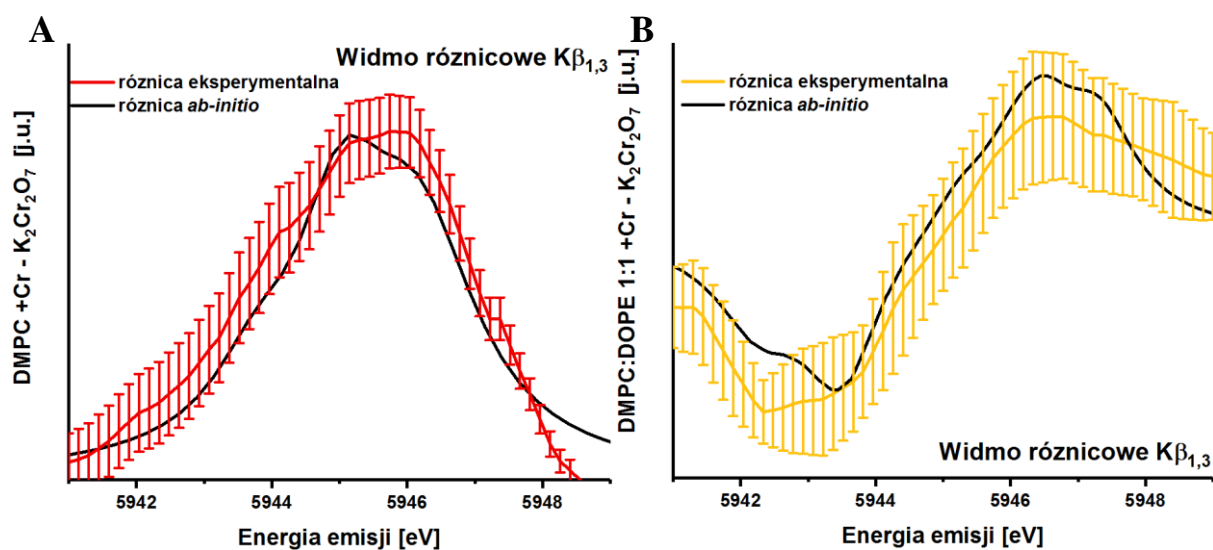
Rysunek VII. 26 Wycięcia z map: A – Δ RXES wykonane wzdłuż energii padającej, szerokość wycięcia 1,5 eV dla energii emisji równej 5946,5 eV; B – RXES wykonane wzdłuż energii padającej, szerokość wycięcia 1,5 eV dla energii emisji równej 5946,5 eV.

padającej, co Rys. VII. 26 A. Warto zwrócić uwagę na wyraźne wzajemne przesunięcie piku przedkrawędziowego $K_2Cr_2O_7$ i DMPC +Cr. Środek wycięć z map RXES i Δ RXES, wykonanych wzdłuż energii wiązki padającej dla energii emisji 5946,5 eV, był dostosowany do położenia nowych rezonansów w mapie RXES próbki DMPC:DOPE 1:1 +Cr oraz w mapach różnicowych Δ RXES DMPC +Cr – $K_2Cr_2O_7$ i DMPC:DOPE 1:1 +Cr – $K_2Cr_2O_7$. W celu zachowania spójnej analizy, wszystkie wycięcia widoczne na Rys. VII 26 A-B były dokonywane przy tej energii i w konsekwencji nie objęły one środków maksimów przejść $1s \rightarrow 3d$ na mapie RXES $K_2Cr_2O_7$ oraz na mapie RXES próbki DMPC +Cr. Przesunięcie piku



Rysunek VII. 27 Wycięcia z map: A – Δ RXES wykonane wzdłuż energii emisji, szerokość wycięcia 1,5 eV dla energii emisji równej 5990,5 eV; B – RXES wykonane wzdłuż energii emisji, szerokość wycięcia 1,5 eV dla energii emisji równej 5990,5 eV.

przedkrawędziowego w widmie DMPC + Cr (5993 eV), względem $K_2Cr_2O_7$ (5993,9 eV) na Rys. VII. 26 B, odtwarza zaobserwowaną różnicę w intensywności przy energii 5992 eV na Rys. VII. 26 A pomiędzy widmami DMPC +Cr, a DMPC:DOPE 10:1 + Cr i DMPC:DOPE 1:1 +Cr. Ostatnią serię wycięć z map Δ RXES wykonano dla energii padającej 5990,5 eV, a szerokość wycięć wyniosła 1,5 eV. Rezultat został pokazany na Rys. VII. 27 A. Mimo, iż we wszystkich wycięciach zakres energii jest taki sam, wykres dla DMPC +Cr – $K_2Cr_2O_7$ znacznie różni się od pozostałych dwóch. Dla porównania, Rys. VII. 27 B przedstawia wycięcia z pełnych map RXES wykonane dla energii padającej 5990,5 eV, z szerokością wycięcia 1,5 eV. Warto zwrócić uwagę na fakt, że widmo DMPC +Cr jest podobne do widma DMPC:DOPE 1:1 + Cr z Rys. VII. 23 B ze względu na obecność trzech lokalnych maksimów przy energiach 5944 eV, 5946 eV i 5942 eV. Wreszcie, aby wyjaśnić przyczynę różnic zaobserwowanych na Rys. VII. 27 A obliczono widma różnicowe *ab-initio* odpowiadające widmom różnicowym DMPC +Cr – $K_2Cr_2O_7$ i DMPC:DOPE 1:1 +Cr – $K_2Cr_2O_7$ na Rys. VII. 27 A. Pierwsze z widm różnicowych *ab-initio* otrzymano odejmując od widma $K\beta_{1,3}$ XES $CrPO_4$ (które odpowiada wiązaniu Cr do grupy fosforanowej w próbce DMPC +Cr) widmo $K_2Cr_2O_7$. Drugą różnicę obliczono odejmując widmo *ab-initio* $K\beta_{1,3}$ XES $K_2Cr_2O_7$ od widma wypadkowego $K\beta_{1,3}$ XES z Rys. VII. 23 B (co odpowiadało wiązaniu Cr w próbce DMPC:DOPE 1:1 Cr). Rezultat odejmowania pokazany jest na Rys. VII. 28 A –B. Jak można zauważyć, w obu przypadkach w granicy niepewności pomiarowej odtworzone zostały doświadczalne widma różnicowe. Należy podkreślić, że pewne różnice widoczne pomiędzy doświadczalnymi widmami różnicowymi, a widmami różnicowymi *ab-initio* są naturalne.

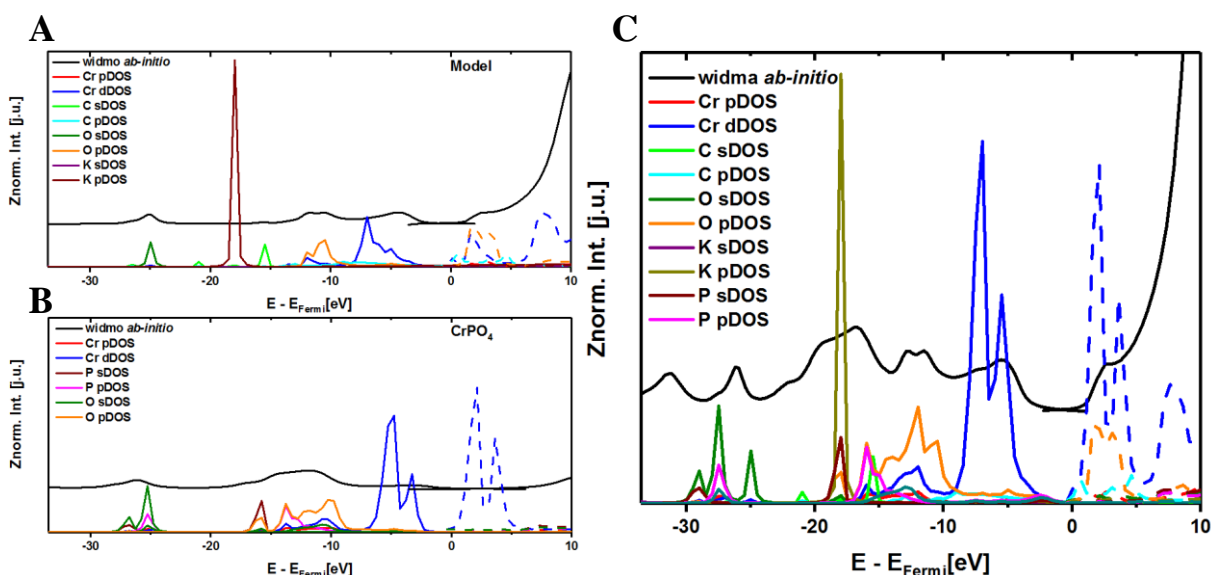


Rysunek VII. 28 A – Widmo różnicowe DMPC +Cr – $K_2Cr_2O_7$ oraz takie samo widmo obliczone teoretycznie; B – Widmo różnicowe DMPC:DOPE 1:1 +Cr – $K_2Cr_2O_7$ oraz takie samo widmo obliczone teoretycznie.

Widma teoretyczne obliczone w programie FEFF z reguły mają nie do końca dopasowane poszerzenia eksperymentalne, i nie da się ich w pełni odtworzyć. Ponadto cięcia map Δ RXES były otrzymywane blisko granicznej szerokości naturalnego kształtu linii widmowej, zatem będą miały nieco inny kształt niż obliczone teoretycznie widma nierezonansowe. Wreszcie, widma XES obliczone przy pomocy algorytmu FMS nie zawierają linii $K\beta'$ i podniesionego tła charakterystycznego dla widm XES. Nie zmienia to faktu, że tak dobra zgodność między obliczeniami, a doświadczeniem w wypadku map różnicowych Δ RXES jest silnym dowodem na poprawność założonego modelu.

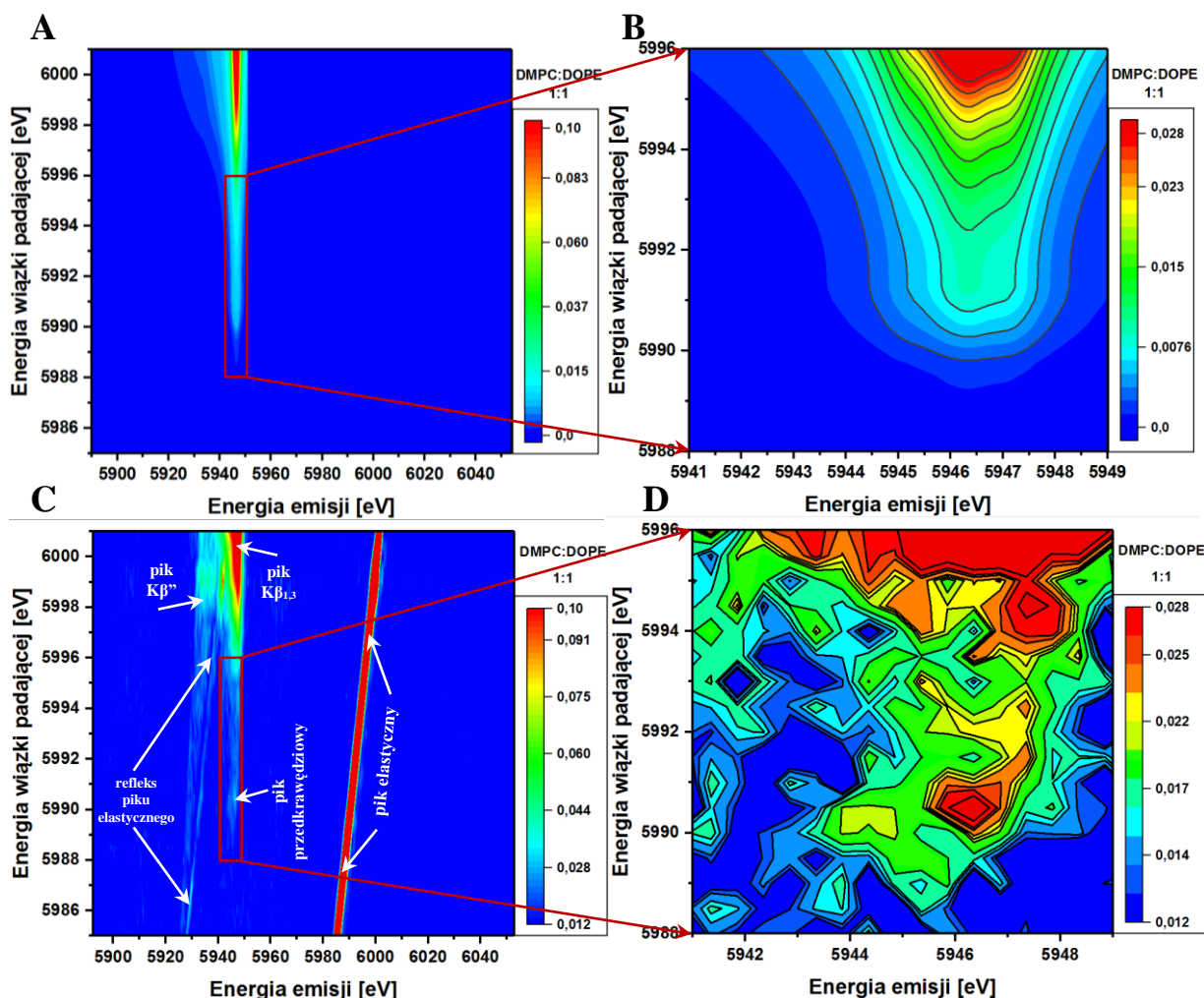
Dodatkowo, na podstawie otrzymanych wyników można przewidzieć strukturę widm v2c liposomów poddanych działaniu Cr(VI), co zostało pokazane na Rys. VII. 29. Wykorzystując wyznaczoną strukturę obu miejsc wiążących Cr i wagi kombinacji liniowej z Rys. VII. 23 A można obliczyć zarówno składowe widm XES odpowiadające miejscom wiążącym nr 1 i 2 (kolejno Rys VII. 29 A i B) jak i całkowite wypadkowe widmo v2c XES liposomów DMPC:DOPE 1:1 +Cr (Rys VII. 29 C). Takie widmo nie podlega dokładnej analizie, gdyż nie można go wiarygodnie porównać z wynikiem eksperymentu, bowiem statystyka pomiaru regionu v2c, pomimo licznych powtórzeń, okazała się zbyt mała.

Ostatnim etapem analizy było obliczenie teoretycznej mapy RXES dla próbki DMPC:DOPE 1:1 +Cr. Obliczeń dokonano przy użyciu widma XAS otrzymanego



Rysunek VII. 29 A – widma *ab-initio* i funkcje DOS dla dwuatomowego modelu wiązania Cr w miejscu wiążącym nr 1 z Rys. VII. 22; B – widma *ab-initio* i funkcje DOS dla CrPO_4 odpowiadające miejscu wiążącemu nr 2 z Rys. VII. 22; C – wypadkowe widmo *ab-initio* i funkcje DOS. Linie przerywane oznaczają stany nieobsadzone. Wszystkie widma na rysunkach A i B zostały przeskalowane zgodnie z wynikiem kombinacji liniowej widm XAS z Rys. VII. 23.

w kombinacji liniowej (Rys. VII. 23 A) i widma wypadkowego $K\beta_{1,3}$ XES z Rys. VII. 23 B w napisanym przez Autora rozprawy programie w środowisku Mathematica 11. Wynik pokazany jest na Rys. VII. 30 A-B. Jak można zauważyć, na mapie teoretycznej z Rys. VII. 30 A brakuje pików elastycznego i pików $K\beta'$ obecnych na mapie doświadczalnej na Rys. VII. 30 C. Równanie Kramersa-Heisenberga, użyte w obliczeniach, pozwala wyznaczyć widma RXES „w pierwszym przybliżeniu”: nie uwzględnia ono zarówno poprawek relatywistycznych, rozproszenia elastycznego jak i rozpraszania wyższego rzędu, które też dają wkład do mapy RXES. Ponadto, widoczna na Rys. VII. 30 mapa jest obciążona tymi samymi niedoskonałościami, które są obecne w widmach *ab-initio* obliczonych przy pomocy programu FEFF. Pozwala więc ona dokonać jedynie jakościowej oceny przyjętego modelu teoretycznego. Zarówno na mapie doświadczalnej jak i *ab-initio* dla DMPC:DOPE 1:1 +Cr maksimum założony model wydaje się być kompletny, z wyjątkiem rezonansu przy energii emisji równej



Rysunek VII. 30 A – Mapa RXES DMPC +Cr otrzymana teoretycznie oraz B – zbliżenie na obszar pików przedkrawędziowych. W celu porównania skopiowano do punktów (C) i (D) zawartość Rys. VII. 16; C – mapa RXES próbki DMPC:DOPE 1:1 +Cr; D – wycięty obszar pików przedkrawędziowych.

5946 eV i energii wiązki padającej 5990,5 eV. Zarówno obliczenia FMS jak i teoretyczna mapa RXES nie uwzględniły tego elementu widma.

W trakcie oddziaływania z błoną nie zawierającą wiązań -HC=CH- , Cr(VI) przyłącza się do grupy fosforanowej, redukując się do Cr(III). Zmiany na powierzchni liposomów zostały zaobserwowane w eksperymencie XRD na Rys. VII. 7. Warto dodać, że procedura dializy wyklucza powstanie kryształów CrPO_4 , gdyż w takim wypadku sól zostałaby usunięta z próbki na drodze dyfuzji. W przypadku obecności wiązań nienasyconych w błonie, konkurują ze sobą dwa mechanizmy. Z jednej strony Cr(VI) ulega redukcji do Cr(III) przyłączając się do powierzchni liposomów, z drugiej strony redukuje się do Cr(IV) tworząc krótko żyjące kanały jonowe, przy czym mechanizm powierzchniowy dominuje. Warto podkreślić, że trwałe wiązanie Cr do błony lipidowej może mieć daleko idące konsekwencje w procesie leczenia organizmu zatrutego Cr(VI). Trwałe wiązanie sprzyja akumulacji Cr w organizmie i powstaniu stanu przewlekłego zatrucia.

Z punktu widzenia spektroskopowego pokazana została różnica pomiędzy pomiarami XAS oraz RXES: metoda dyspersyjna oferuje dostęp do dużo większego zakresu informacji. Informacje te są wzajemnie komplementarne. Podczas jednego eksperymentu można otrzymać informację o elektronowych stanach obsadzonych i nieobsadzonych badanego pierwiastka, zidentyfikować ligandy przyłączone do niego oraz prześledzić na przykład zmiany stopnia utlenienia. Bardzo dużą zaletą metody RXES jest fakt, iż widma XAS i XES otrzymane w eksperymencie z tej samej mapy, są wzajemnie skalibrowane energetycznie, co ułatwia analizę i uwiarygadnia otrzymane wyniki. Warto zaznaczyć, że dobrze wykonany pomiar pozwala zidentyfikować nawet dyskretne różnice występujące pomiędzy badanymi próbkami. Umożliwia on wykonanie pomiaru z rozdzielczością energetyczną lepszą niż szerokość naturalna linii widmowej i otrzymać widma HR-XAS i HR-XES. Są one pozbawione poszerzenia pochodzącego od stanu początkowego układu. W trakcie pomiarów XAS i RXES należy pamiętać o efekcie uszkodzeń radiacyjnych. Dodatkowo, pomiar RXES jest bardziej wymagający technicznie od eksperymentu XAS.

VII. 4 Podsumowanie

W trakcie eksperymentów nad oddziaływaniem Cr(VI) z błoną lipidową zbadano jego wpływ na liposomy zbudowane z fosfolipidów DMPC oraz DMPC i DOPE w stosunku ilościowym 100:1, 10:1, 5:1 i 1:1. Takie próbki pozwoliły zbadać wpływ nasycenia i płynności błony na przenikanie Cr przez nie. Próbki liposomów poddawane były działaniu Cr(VI), a następnie były dializowane w celu usunięcia całego niezwiązanego Cr. W trakcie eksperymentu:

- Przeprowadzono pomiary XRF, XRD, XAS oraz RXES;
- Przy pomocy metody XRD wykazano zmiany strukturalne zachodzące we wszystkich próbkach liposomów pod wpływem Cr(VI) oraz możliwe ustrukturyzowanie powierzchni liposomów DMPC +Cr i DMPC:DOPE 100:1 +Cr;
- W trakcie oddziaływania z błonami, Cr(VI) redukował się do niższego stopnia utlenienia, i wiązał trwale z błonami lipidowymi. Wykazano, iż zarówno przy braku wiązań $-HC=CH-$ jak i w ich obecności Cr wiązał się do błon lipidowych, przy czym wraz ze wzrostem ilości wiązań nienasyconych rosła także ilość Cr przywiązanego do błony co opisano jakościowo i ilościowo przy pomocy pomiarów XAS i XRF;
- Zaproponowano model oddziaływania Cr z błoną fosfolipidową zawierającą wiązania $-HC=CH-$. W tym modelu powstawały krótko żyjące kanały jonowe zwiększające przepływ Cr przez błonę. Nie udało się jednak zidentyfikować formy chemicznej adduktów, gdyż widma XAS zawierały zbyt mało informacji;
- Przy pomocy techniki RXES udało się wykonać pomiary próbek DMPC +Cr, DMPC:DOPE 10:1 +Cr oraz DMPC: DOPE 1:1 + Cr;
- Zidentyfikowano dwa miejsca wiążące Cr: w miejscu wiązania $-HC=CH-$ oraz przy grupie fosforanowej fosfolipidów. W ten sposób wytłumaczono obecność Cr w błonie przy braku wiązań $-HC=CH-$ oraz uzupełniono poprzedni model oddziaływania o proces wiązania Cr do powierzchni fosfolipidów;
- Otrzymane wyniki zostały potwierdzone przez obliczenia *ab-initio* oraz obliczenie teoretycznej mapy RXES dla próbki DMPC:DOPE 1:1 +Cr;
- Model oddziaływania Cr(VI) z błoną lipidową zbudowany w oparciu o pomiary XAS, XRD i XRF został potwierdzony i rozbudowany dzięki wynikom eksperymentu RXES.

VIII. Wnioski końcowe

Spektroskopia rentgenowska stanowi ważne narzędzie fizyki doświadczalnej. Metody spektroskopii rentgenowskiej rozwinęły się intensywnie wraz z użyciem III generacji synchrotronów. Dwie najważniejsze techniki, których używa się rutynowo w trakcie badań struktury elektronicznej atomów to XAS i XES. Metoda XAS, w części przykrawędziowej widma absorpcyjnego, pozwala otrzymać informację o elektronicznych stanach nieobsadzonych badanego atomu, czyli tych znajdujących się powyżej poziomu Fermiego. Z kolei, w większej odległości energetycznej od krawędzi absorpcji, widmo zawiera informację strukturalną (EXAFS). Z drugiej strony, XES pozwala zbadać elektroniczne stany obsadzone oraz zidentyfikować ligandy przyłączone do badanego atomu. Oprócz tych popularnych technik eksperymentalnych, wykorzystujących promieniowanie X od dwóch dekad intensywnie rozwija się również technika RXES. Technika ta wykorzystuje zjawisko rezonansowej emisji promieniowania charakterystycznego w pobliżu krawędzi absorpcji. RXES łączy w sobie możliwości pomiarów XAS i XES, a informacja jest najczęściej otrzymywana w postaci dwuwymiarowych map RXES.

W trakcie przeprowadzonych badań, przy pomocy spektroskopii rentgenowskiej, wykonano pomiary trzech klas związków chemicznych: 1) nieorganicznych kryształów, 2) białek i 3) błon lipidowych. Metodologia pomiarów XAS, XES i RXES pierwotnie była dedykowana fizyce ciała stałego, na przykład w celu badania własności półprzewodników. Głównym celem pracy było wykorzystanie tych technik do pomiarów widm metali bloku d w próbkach związków organicznych, nieustrukturyzowanych i niehomogenicznych, opracowanie metodologii wykonania eksperymentów i analizy danych oraz wykazanie przydatności metod XAS i RXES do wykonywania doświadczeń z użyciem próbek z grupy materii miękkiej. W tym celu, jako wprowadzenie do analizy widm rentgenowskich, wykonano pomiary RXES przy krawędzi K żelaza próbek Fe, α -Fe₂O₃, oraz Fe(NO₃)₃. Dzięki tym pomiarom opracowano metodologię analizy widm RXES oraz wykazano mocne i słabe strony metody.

Drugim eksperymentem były pomiary widm XAS kompleksów białka PrP^C-Cu(II) w różnym otoczeniu chemicznym. Białka należą do heterogenicznych struktur, jednakże wykazują uporządkowanie w rejonie miejsca wiążącego metal. W trakcie eksperymentu wykorzystano wszystkie możliwości, jakie daje metoda XANES w połączeniu z obliczeniami DFT i FMS. Umożliwiło to zidentyfikowanie miejsc wiążących Cu(II) w białku oraz ich

wzajemnej relacji ilościowej. Ponadto, dzięki wykonanym obliczeniom zidentyfikowano unikatowy mechanizm transferu ładunku z ligandów na metal (LMCT). W tym eksperymencie metoda XAS, dzięki wsparciu zaawansowanych obliczeń, pozwoliła rozwiązać problem badawczy w oparciu o dane literaturowe.

W trzecim doświadczeniu, przy pomocy metod spektroskopii rentgenowskiej oraz metod pomocniczych, badany był wpływ Cr(VI) na strukturę sztucznych błon lipidowych. W porównaniu do białek, błony lipidowe mają inny charakter uporządkowania, gdyż występują w formie dwu- lub wielowarstw fosfolipidów. W trakcie eksperymentu, przebadano wpływ zawartości wiązań $-HC=CH-$ na proces redukcji Cr(VI). Badania były prowadzone w dwóch etapach. W pierwszym, przy pomocy metod XAS, XRD i XRF wykazano redukcję Cr(VI) \rightarrow Cr(IV) przy jednoczesnym przenikaniu Cr przez błony lipidowe. Ponadto, udowodniono trwałe wiązanie się Cr do błony lipidowej oraz opisano ten proces ilościowo i jakościowo. Połączenie metod XAS, XRD i XRF okazało się jednak niewystarczające, aby jednoznacznie potwierdzić zaproponowany model oddziaływania i przenikania Cr przez błony lipidowe.

Drugim etapem badań nad oddziaływaniem Cr z błonami lipidowymi było wykonanie pomiarów RXES. W trakcie analizy wyników wykorzystano unikatowe możliwości, jakie dają pomiary RXES w połączeniu z obliczeniami *ab-initio*: czułość i selektywność. Dzięki jednoczesnemu pomiarowi zarówno widm emisyjnych jak i absorpcyjnych, dwuwymiarowe mapy RXES umożliwiły identyfikację różnych składowych widm. Pomiar widm RXES pozwolił obliczyć widma Δ RXES DMPC +Cr – $K_2Cr_2O_7$ i DMPC:DOPE 10:1 +Cr – $K_2Cr_2O_7$. Umożliwiło to zidentyfikowanie składowych widm XAS DMPC:DOPE 1:1 +Cr i uzupełnienie modelu oddziaływania Cr(VI) z błoną lipidową o oddziaływanie z grupami fosforowymi na powierzchni. Udało się także obliczyć teoretyczną mapę RXES dla próbki DMPC:DOPE 1:1 +Cr, która była zgodna z mapą otrzymaną doświadczalnie. Pewnym ograniczeniem wykorzystanej metody, okazały się: czasochłonność pomiarów oraz ich mała statystyka w rejonie v_2c XES. Udało się jednakże ominąć ten problem, analizując strukturę linii $K\beta_{1,3}$.

Przeprowadzona analiza pokazuje, że dużo większą ilość wzajemnie komplementarnych informacji można otrzymać analizując mapy RXES w porównaniu do pomiarów XAS. Należy jednak pamiętać, że pomiary RXES są bardziej wymagające technicznie niż pomiary XAS. Wreszcie, w przypadku lżejszych pierwiastków takich jak Cr, zarówno w metodzie XAS jak i RXES ważne jest zminimalizowanie strat zarówno wiązki pierwotnej jak i emitowanej fluorescencji, pojawiających się w wyniku oddziaływania z ośrodkiem będącym na drodze optycznej promieniowania, na przykład powietrzem.

Wszystko to powoduje, że bez odpowiedniego zabezpieczenia mierzonej substancji oraz odpowiedniej metodologii pomiarów, wrażliwa próbka może szybko ulec zniszczeniu. W niniejszej rozprawie, udało się pokazać rozwiązania metodologiczne, dzięki którym pomiary RXES można przeprowadzać nawet z wykorzystaniem próbek organicznych zawierających lekkie metale grupy d Układu Okresowego, co jednoznacznie potwierdza prawdziwość postawionej tezy.

ZAŁĄCZNIKI

Załącznik A

Kod programu napisanego w języku C++, pozwalający dodać efekt samoabsorpcji (SA) do widm teoretycznych obliczonych *ab-initio* w programie FEFF 9.6. Poniższy przykład przedstawia kod wraz z parametrami dobranymi do obliczeń dla α -Fe₂O₃.

```
#include <iostream>
#include <cstdlib>
#include <cmath>
#include <fstream>
#include <string>

using namespace std;

// parametry układu fizycznego

float ni_ph;
float ni_tot=70.89;
float rho=5.26;
float I0=1;

float glebokosc()
{
    float d;
    cout << "Grubosc probki:";
    cin >> d;
    return d;
}

void samoabsorpcja(float d)
{
    float calka;
    string wiersz, wiersz1, str_X, str_Y;
    float recalc_Y1, fl_Y, A, B, recalc_Y2;
    fstream plik, plik_out;
    plik.open("feff_out.txt");
    plik_out.open("SA_feff_out.txt");
    B=(sqrt(2)/2)*ni_tot*rho;
    for (int i=0; !plik.eof()==true; i++)
    {
        getline(plik,wiersz);
        if(wiersz=="") break;
        wiersz1=wiersz;
    }
}
```

1

2

3

4

```

        str_X=wiersz.substr(0,8);
        fl_Y=strtod((wiersz1.substr(9)).c_str(), NULL);
        A=(sqrt(2)/2)*fl_Y*rho;
        recalc_Y1=(sqrt(2)/2)*((1/B)*(1-exp(-B*d)));
        recalc_Y2=(sqrt(2)/2)*(1/(A+B))*(exp(-d*(A+B))-1);
        cout << str_X << "      " << recalc_Y1 + recalc_Y2 << "\n";
        plik_out << str_X << "    " << recalc_Y1 + recalc_Y2 << "\n";
    }
    plik.close();
    plik_out.close();
}

int main()
{
    float d = glebokosc();
    samoabsorpcja(d);
    system("PAUSE");
    return 0;
}

```

Poszczególne etapy działania programu, oznaczone w kodzie numerami 1 – 8 odpowiadają za:

- 1) Globalne parametry obliczeń:
 - a) Parametr ni_{ph} – całkowity współczynnik absorpcji promieniowania dla określonej energii wiązki $[cm^2/g]$;
 - b) Parametr ni_{tot} – współczynnik absorpcji promieniowania dla linii $K\alpha$ pierwiastka $[cm^2/g]$;
 - c) Parametr rho – gęstość materiału;
 - d) Parametr $I0$ – intensywność wiązki, tutaj znormalizowana do 1;
- 2) Funkcja *glebokosc* pobierająca od użytkownika grubość próbki d w $[cm]$;
- 3) Funkcja *samoabsorpcja* modyfikująca widmo *ab-initio* punkt po punkcie, poprzez dodanie do widma teoretycznego efektu samoabsorpcji. Funkcja jako argument przyjmuje pobrany wcześniej parametr d ;
- 4) Fragment funkcji *samoabsorpcja* odpowiadający za wczytanie widma *ab-initio* ("feff_out.txt"), stworzenie pliku wynikowego ("SA_feff_out.txt"), zdefiniowanie wszystkich zmiennych wykorzystywanych w toku działania funkcji, w tym zmiennej roboczej A ;
- 5) Fragment funkcji *samoabsorpcja* odpowiadający za modyfikację widma *ab-initio* oraz za zapisanie go w pliku wynikowym;

- 6) Funkcja główna programu, wykonująca funkcje *glebokosc* oraz *samoabsorpcja* i kończąca działanie programu;

Załącznik B

Kod programu napisanego w środowisku Mathematica 11, do celu obliczania map RXES. Mapy były obliczane na podstawie widm *ab-initio* w programie FEFF 9.6. Poniższy przykład przedstawia kod wraz z parametrami dobranymi do obliczeń dla α -Fe₂O₃.

```
dane1 = Import["C:\\Users\\user\\Desktop\\rixs_fe2o3\\xas.dat", "Data", RecordLists → True];
|importuj |listy rejestru |prawda 1
dane2 = Import["C:\\Users\\user\\Desktop\\rixs_fe2o3\\xes.dat", RecordLists → True];
|importuj |listy rejestru |prawda
p1 = ListPlot[dane1, PlotStyle → Black];
|wykres danych z li... |styl grafiki |czarny
p2 = ListPlot[dane2, PlotStyle → Red, PlotRange → All];
|wykres danych z listy |styl grafiki |cz... |zakres wykr... |wszystko 2
Show[p1, p2, PlotRange → All]
|pokaż |zakres wykr... |wszystko
dane11 = Table[{dane1[[i, 1]], dane1[[i, 2]]}, {i, Length[dane1]}];
|tabela |długość
testFzas = Interpolation[dane11, InterpolationOrder → 1];
|interpolacja |porządek interpolacji
Plot[testFzas[x + w1s + 4], {x, 7105 - w1s, 7220 - w1s}, PlotRange → Full]
|wykres |zakres wykr... |kompletny 3
dane22 = Table[{dane2[[i, 1]], dane2[[i, 2]]}, {i, Length[dane2]}];
|tabela |długość
testFxes = Interpolation[dane22, InterpolationOrder → 1];
|interpolacja |porządek interpolacji
Plot[testFxes[x + w1s], {x, 7052 - w1s, 7120 - w1s}, PlotRange → Full]
|wykres |zakres wykr... |kompletny

m = 9.10038 * 10^(-31)
r0 = 0.52918 * 10^(-10);
hkr = 1;
ab = (2 * Pi * r0^2);
|pi
abc = ab * 3 * 10^(-8); 4

w1s = 7126;
gam1s = 1.19;
gam2p = 0.1;

(*Emisja*)

Eem0 = 7052;
Eem1 = 7120;
krokEm = 0.5; 5

(*Absorpcja*)

Eabs0 = 7105;
Eabs1 = 7220;
krokAbs = 0.5; 6
```

```

mapaRXES = Table[Sum[Sum[ ((w2/w1) * ((w1s + ww) * testFxes[w + w1s] * (w1s + w) *
|tabela |s... |sumowanie
    testFxes[w + w1s]) / ((w1s + w - w1) * (w1s + w - w1) + gam1s * gam1s / (4)) *
    ((gam2p / (2 * Pi))) / ((w1 + ww - w - w2) * (w1 + ww - w - w2) + (gam2p / (2)) *
|pi
    (gam2p / (2))), {ww, -74, -4, 0.25}], {w, -20, 100, 0.5}], {w1, Eabs0, Eabs1, krokAbs},
    {w2, Eem0, Eem1, krokEm}];
mapaRXESscaled = mapaRXES * ab;

ListContourPlot[mapaRXESscaled]
|wykres konturowy listy
Export["C:\\Users\\user\\Desktop\\rixs_fe203\\hematyt.out", mapaRXESscaled, "Table"]
|eksportuj

```

7

8

Poszczególne etapy działania programu, oznaczone w kodzie numerami 1 – 8 odpowiadają za:

- 1) Wczytanie widm *ab-initio* z programu FEFF;
- 2) Wizualizacja wczytanych widm;
- 3) Interpolacja liniowa w celu zamiany formatu wczytanych widm z punktów na dane ciągłe;
- 4) Globalne parametry obliczeń:
 - a) Parametr m – masa spoczynkowa elektronu;
 - b) Parametr r_0 – klasyczny promień elektronu w atomie wodoru;
 - c) Parametr $hkr - \hbar$ – stała Diraka;
 - d) Parametr $w1s$ – położenie krawędzi absorpcji;
 - e) Parametr $gam1s$ – czas życia dziury rdzeniowej (stanu początkowego);
 - f) Parametr $gam2p$ – czas życia stanu końcowego;
- 5) Parametry specyficzne dla widma XES:
 - a) Parametr $Eem0$ – niskoenergetyczna granica zakresu energii emisji;
 - b) Parametr $Eem1$ – wysokoenergetyczna granica zakresu energii emisji;
 - c) Parametr $krokEm$ – energetyczny krok obliczeń;
- 6) Parametry specyficzne dla widma XES:
 - a) Parametr $Eabs0$ – niskoenergetyczna granica zakresu energii absorpcji;
 - b) Parametr $Eabs1$ – wysokoenergetyczna granica zakresu energii absorpcji;
 - c) Parametr $krokAbs$ – energetyczny krok obliczeń;
- 7) Obliczenie mapy RXES (równanie Kramersa-Heisenberga) oraz wymnożenie jej razy stały czynnik ab ;
- 8) Kontrolna wizualizacja wyniku i zapis wyniku w pliku tekstowym

Załącznik C

1. Struktura pliku wejściowego do programu ORCA 4.00.2:

```
! UKS BP86 RI SV(P) Opt TightSCF Grid4
NoFinalGrid

%geom GDIISMaxEq 20
      UseGDIIS true
      MaxIter 1000
      end
%scf  MaxCore 4096
      MaxIter 1000
      end

* xyzfile x y filename.xyz
```

gdzie: xyzfile – nazwa pliku z początkową strukturą; x – multipletowość kompleksu; y – całkowity ładunek kompleksu;

2. Struktura modelu kompleksu PrP^C-Cu(II) a zoptymalizowana w programie ORCA 4.00.2 przy pomocy pliku wejściowego z punktu nr 1:

Atom	Współrzędne		
	x [Å]	y [Å]	z [Å]
Cu	0,546	0,345	0,261
C	2,726	-1,540	-0,791
C	2,845	0,256	1,979
C	3,741	-0,876	1,517
C	0,485	-1,608	-1,696
C	-0,903	-0,993	-1,712
C	-2,161	0,848	-0,619
C	-1,707	2,084	0,166
C	0,171	3,055	1,402
C	-0,210	2,900	2,928
H	0,736	-2,393	-2,438
H	-2,577	1,157	-1,607
H	-2,998	0,373	-0,051
H	1,281	2,986	1,360
H	-0,181	4,048	1,041
H	-0,108	0,207	2,856
H	-0,657	-1,260	2,497
N	1,319	-1,146	-0,835
N	-1,020	-0,015	-0,748
N	-0,367	2,013	0,593
N	-0,651	4,010	3,533
N	4,980	-0,925	1,931
O	2,234	0,894	0,913
O	-1,797	-1,317	-2,480
O	-2,416	3,036	0,446
O	-0,055	1,811	3,496
O	0,034	-0,598	2,267
H	5,365	-0,203	2,565

H	-0,815	4,889	3,030
C	3,223	-1,966	0,621
H	3,323	-0,683	-1,173
H	2,882	-2,394	-1,486
H	2,387	-2,466	1,166
H	4,012	-2,735	0,479
H	2,114	-0,216	2,694
H	3,438	0,996	2,574
H	-0,900	3,972	4,531
H	5,626	-1,689	1,670

3. Struktura modelu kompleksu PrP^C-Cu(II) **b** zoptymalizowana w programie ORCA 4.00.2 przy pomocy pliku wejściowego z punktu nr 1:

Atom	Współrzędne		
	x [Å]	y [Å]	z [Å]
Cu	-1,164	0,754	0,297
O	-2,152	-0,762	-0,818
O	0,156	-0,751	1,310
C	-0,267	2,607	2,564
N	-0,528	2,476	1,192
N	0,116	3,845	2,942
C	-0,302	3,697	0,695
C	0,107	4,562	1,819
C	-2,724	-0,425	2,674
N	-3,870	-0,407	3,392
N	-2,654	0,550	1,671
C	-4,579	0,594	2,873
C	-3,811	1,214	1,772
N	-0,067	1,079	-1,367
C	1,231	0,943	-1,499
C	-0,567	1,387	-2,713
N	1,738	1,124	-2,787

C	0,694	1,388	-3,525
H	1,006	-0,752	1,804
H	-0,364	1,762	3,264
H	-0,410	3,953	-0,369
H	0,378	5,631	1,784
H	-1,897	-1,129	2,848
H	-5,579	0,880	3,239
H	-4,090	2,059	1,124
H	1,901	0,696	-0,660
H	-1,103	2,367	-2,742
H	0,771	1,586	-4,609
C	-2,162	-1,995	-0,887
H	-1,308	0,624	-3,051
C	-3,090	-2,772	-1,776
O	-1,292	-2,686	-0,119
H	0,009	-1,662	0,952
H	-1,370	-3,666	-0,239
H	-2,512	-3,400	-2,494
H	-3,747	-2,083	-2,341
H	-3,724	-3,459	-1,169

Załącznik D

1. Struktura pliku wejściowego do programu ORCA 4.00.2 użyta do optymalizacji geometrii kompleksu liposomów z Cr:

```
! UKS BP86 RI SV(P) Opt TightSCF Grid4
NoFinalGrid

%geom GDIISMaxEq 20
      UseGDIIS true
      MaxIter 1000
      end

%scf  MaxCore 4096
      MaxIter 1000
      end

* xyzfile x y filename.xyz
```

gdzie: xyzfile – nazwa pliku z początkową strukturą;

x – multipletowość kompleksu;

y – całkowity ładunek kompleksu;

2. Struktura modelu kompleksu liposomów z Cr zoptymalizowana w programie ORCA 4.00.2 przy pomocy pliku wejściowego z punktu nr 1:

Atom	Współrzędne		
	x [Å]	y [Å]	z [Å]
C	-6,293	-6,293	-6,293
Cr	-3,440	-3,440	-3,440
Cr	-0,939	-0,939	-0,939
O	-3,029	-3,029	-3,029
O	-2,608	-2,608	-2,608
O	0,167	0,167	0,167
K	-0,675	-0,675	-0,675
C	-6,691	-6,691	-6,691
C	-6,056	-6,056	-6,056
C	-7,041	-7,041	-7,041
H	-6,182	-6,182	-6,182
H	-7,309	-7,309	-7,309
H	-7,906	-7,906	-7,906
H	-5,843	-5,843	-5,843
H	-7,558	-7,558	-7,558
C	-5,735	-5,735	-5,735
H	-4,747	-4,747	-4,747
H	-6,508	-6,508	-6,508
H	-5,692	-5,692	-5,692
H	-6,972	-6,972	-6,972
H	-5,229	-5,229	-5,229
O	-5,193	-5,193	-5,193
H	-7,138	-7,138	-7,138
O	-2,531	-2,531	-2,531
O	-0,414	-0,414	-0,414
H	-0,113	-0,113	-0,113
H	-2,515	-2,515	-2,515

C	-6,293	-6,293	-6,293
Cr	-3,440	-3,440	-3,440
Cr	-0,939	-0,939	-0,939

Załącznik E

Spis publikacji Autora rozprawy

1. Michał Nowakowski*, Joanna Czapla-Masztafiak*, Jakub Szlachetko, Wojciech M. Kwiatek, „Electronic structure of Fe, α -Fe₂O₃ and Fe(NO₃)₃ × 9 H₂O determined using RXES” *Chem. Phys.*, 2017, DOI: 10.1016/j.chemphys.2017.06.002
2. Michał Nowakowski*, Joanna Czapla-Masztafiak, Maciej Kozak, Igor Zhukov, Lilia Zhukova, Jakub Szlachetko and Wojciech M. Kwiatek „Preliminary results of human PrP^C protein studied by spectroscopic techniques”, *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B- Beam Interactions With Materials and Atoms*, 2017, DOI: 10.1016/j.nimb.2017.06.022
3. Anna M. Borkowska*, M. Nowakowski*, G. Lis, K. Wehbe, G. Cinque, and W. M. Kwiatek “Structure of human aortic valve studied by high flux SR-FTIR microscopy”, *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B- Beam Interactions With Materials and Atoms*, 2017, DOI: 10.1016/j.nimb.2017.06.021
4. A. M. Borkowska*, M. Nowakowski, J. Miszczyk, E. W. Lipiec, J. Wiltowska-Zuber, K. Rawojć and W. M. Kwiatek, “Comparison of methods in studies of cell death mechanisms”, *Acta Phys. Pol. A*, 2017, DOI: 10.12693/aphyspol.133.263
5. Ewa Pięta*, Janusz Lekki, Julio M. del Hoyo-Meléndez, Czesława Paluszkiewicz, Michał Nowakowski, Marta Matosz, Wojciech M. Kwiatek, “Surface characterization of medieval silver coins minted by the Early Piasts”, *Surface and Interface Analysis*, 2017, DOI: 10.1002/sia.6338
6. Maciej B. Gielnik*, Michał Nowakowski, Aneta Szymańska, Igor Zhukov, Wojciech Maria Kwiatek, Maciej Leszek Kozak “Fibrillation of N-Terminal Prion Protein Fragment in Presence of Zinc Ions”, *Biophysical Journal*, 2018, DOI: 10.1016/j.bpj.2017.11.2379
7. Maciej Gielnik*, Michał Nowakowski, Michał Taube, Igor Zhukov, Wojciech M. Kwiatek, Dmitry M. Lesovoy, Maciej Kozak, „Conformational Dynamics of Human Prion Protein and Binding Sites of Zn Cations”, *Biophysical Journal*, 2018, DOI: 10.1016/j.bpj.2017.11.2141
8. Anastasia Mikhalchan*, Agnieszka M. Banas, Krzysztof Banas, Anna M. Borkowska, Michał Nowakowski, Mark B. H. Breese, Wojciech M. Kwiatek, Czesława Paluszkiewicz, and Tong Earn Tay, “Revealing Chemical Heterogeneity of CNT Fiber Nanocomposites via Nanoscale Chemical Imaging”, *Chemistry of Materials*, 2018, DOI: 10.1021/acs.chemmater.7b04065
9. Anastasia Mikhalchan, Thurid Gspann, Jeronimo Terrones, Agnieszka Banas, Krzysztof Banas, Michał Nowakowski, Mark B. H. Breese, Czesława Paluszkiewicz, Wojciech Maria Kwiatek, James A Elliott, Alan Windle “From single CNT fibre to high volume fraction reinforced composites: insights into epoxy infiltration and curing via direct chemical imaging” *Carbon*, June 2018, Accepted.
10. Michał Nowakowski, Joanna Czapla-Masztafiak, Igor Zhukov, Lilia Zhukova, Maciej Kozak, Wojciech M. Kwiatek „Electronic Properties of PrP^C-Cu(II) complex as a marker of 5-fold Cu(II) coordination”, *Metallomics*, 2019, DOI: 10.1039/C8MT00339D

Literatura

- [1] Rigaku Corporation, Replicated optics for EUV and X-ray radiation, (2017). <https://www.rigaku.com/en/products/optics/replicated> (accessed December 21, 2017).
- [2] M. Petric, M. Kavčič, Chemical speciation via X-ray emission spectroscopy in the tender X-ray range, *J. Anal. At. Spectrom.* 31 (2016) 450–457. doi:10.1039/C5JA00394F.
- [3] F.E. Zink, The AAPM/RSNA Physics Tutorial for Residents, *RadioGraphics.* 17 (1997) 1259–1268. doi:10.1148/radiographics.17.5.9308113.
- [4] A. Balerna, S. Mobilio, Introduction to Synchrotron Radiation, in: S. Mobilio, F. Boscherini, C. Meneghini (Eds.), *Synchrotron Radiat. Basics, Methods Appl.*, Springer, Bologna, 2015: pp. 3–28. doi:10.1007/978-3-642-55314-8_1.
- [5] G. Margaritondo, Characteristics and Properties of Synchrotron Radiation, in: S. Mobilio, F. Boscherini, C. Meneghini (Eds.), *Synchrotron Radiat. Basics, Methods Appl.*, Springer, Bologna, 2015: pp. 29–63. doi:10.1007/978-3-642-55314-8_2.
- [6] D.H. Tomboulion, P.L. Hartman, Spectral and Angular Distribution of Ultraviolet Radiation from the 300-Mev Cornell Synchrotron, *Phys. Rev.* 102 (1956) 1423–1447. doi:10.1103/PhysRev.102.1423.
- [7] ALBA, Accelerators/insertion-devices, (2014). <https://www.cells.es/en/accelerators/insertion-devices> (accessed December 27, 2018).
- [8] G. Aquilanti, L. Vaccari, J. Rikkert Plaisier, A. Goldoni, Instrumentation at Synchrotron Radiation Beamlines, in: S. Mobilio, F. Boscherini, C. Meneghini (Eds.), *Synchrotron Radiat. Basics, Methods Appl.*, Springer, Bologna, 2015: pp. 65–104. doi:10.7007/978-3-642-55315-8_3.
- [9] P64 Advanced X-ray Absorption Spectroscopy - beamline layout, (2018). http://photon-science.desy.de/facilities/petra_iii/beamlines/p64_advanced_xafs/beamline_layout/index_eng.html (accessed January 15, 2019).
- [10] M. Newville, Fundamentals of XAFS, *ReVision.* (2004) 43. doi:10.2138/rmg.2014.78.2.
- [11] P. Fornasini, Introduction to X-Ray Absorption Spectroscopy, in: S. Mobilio, F. Boscherini, C. Meneghini (Eds.), *Synchrotron Radiat. Basics, Methods Appl.*, Springer, Bologna, 2015: pp. 181–211. doi:10.1007/978-3-642-55315-8_6.
- [12] E.A. Stern, K. Kim, Thickness effect on the extended-x-ray-absorption-fine-structure amplitude, *Phys. Rev. B.* 23 (1981) 3781–3787. doi:10.1103/PhysRevB.23.3781.
- [13] J. Jaklevic, J.A. Kirby, M.P. Klein, A.S. Robertson, G.S. Brown, P. Eisenberger,

- Fluorescence detection of exafs: Sensitivity enhancement for dilute species and thin films, *Solid State Commun.* 23 (1977) 679–682. doi:10.1016/0038-1098(77)90548-8.
- [14] O. Klein, T. Nishina, Uber die Streuung von Strahlung durch freie Elektronen nach der neuen relativistischen Quantendynamik von Dirac, *Zeitschrift Fur Phys.* 52 (1929) 853–868. doi:10.1007/BF01366453.
- [15] F. Meirer, G. Pepponi, C. Strelì, P. Wobrauschek, P. Kregsamer, N. Zoeger, G. Falkenberg, Parameter study of self-absorption effects in Total Reflection X-ray Fluorescence-X-ray Absorption Near Edge Structure analysis of arsenic, *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 63 (2008) 1496–1502. doi:10.1016/j.sab.2008.05.004.
- [16] F. Meirer, G. Pepponi, C. Strelì, P. Wobrauschek, P. Kregsamer, N. Zoeger, G. Falkenberg, Parameter study of self-absorption effects in Total Reflection X-ray Fluorescence-X-ray Absorption Near Edge Structure analysis of arsenic, *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 63 (2008) 1496–1502. doi:10.1016/j.sab.2008.05.004.
- [17] J. Goulon, C. Goulon-Ginet, R. Cortes, J.M. Dubois, On experimental attenuation factors of the amplitude of the EXAFS oscillations in absorption, reflectivity and luminescence measurements, *J. Phys.* 43 (1982) 539–548. doi:10.1051/jphys:01982004303053900.
- [18] D. Haskel, FLUO: Correcting XANES for self-absorption in fluorescence measurements, (1999).
- [19] P. Glatzel, M. Sikora, G. Smolentsev, M. Fernández-García, Hard X-ray photon-in photon-out spectroscopy, *Catal. Today.* 145 (2009) 294–299. doi:10.1016/j.cattod.2008.10.049.
- [20] M. Deutsch, G. Holzer, J. Hartwig, J. Wolf, M. Fritsch, E. Foerster, K-alpha and K-beta x-ray emission spectra of copper M., *Phys. Rev. A.* 51 (1995).
- [21] G. Vankó, T. Neisius, G. Molnár, F. Renz, S. Kárpáti, A. Shukla, F.M.F. De Groot, Probing the 3D spin momentum with X-ray emission spectroscopy: The case of molecular-spin transitions, *J. Phys. Chem. B.* 110 (2006) 11647–11653. doi:10.1021/jp0615961.
- [22] M. Bauer, HERFD-XAS and valence-to-core-XES: new tools to push the limits in research with hard X-rays?, *Phys.Chem.Chem.Phys.* 16 (2014) 13827–13837. doi:10.1039/c4cp00904e.
- [23] A.M. March, T.A. Assefa, C. Bressler, G. Doumy, A. Galler, W. Gawelda, E.P. Kanter, Z. Németh, M. Pápai, S.H. Southworth, L. Young, G. Vankó, Feasibility of Valence-to-Core X-ray Emission Spectroscopy for Tracking Transient Species, *J. Phys. Chem. C.* 119 (2015) 14571–14578. doi:10.1021/jp511838q.

- [24] N. Lee, T. Petrenko, U. Bergmann, F. Neese, S. Debeer, Probing valence orbital composition with iron $K\beta$ x-ray emission spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 9715–9727. doi:10.1021/ja101281e.
- [25] C.J. Pollock, S. Debeer, Valence-to-core X-ray emission spectroscopy: A sensitive probe of the nature of a bound ligand, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 5594–5601. doi:10.1021/ja200560z.
- [26] J. Kawai, C. Suzuki, H. Adachi, T. Konishi, Y. Gohshi, Charge-transfer effect on the linewidth of Fe $K\alpha$ x-ray fluorescence spectra, *Phys. Rev. B.* 50 (1994). doi:10.1103/PhysRevB.50.11347.
- [27] P. Glatzel, T. Weng, K. Kvashnina, J. Swarbrick, M. Sikora, E. Gallo, N. Smolentsev, R. Alonso, Journal of Electron Spectroscopy and Reflections on hard X-ray photon-in / photon-out spectroscopy for electronic structure studies, *J. Electron Spectros. Relat. Phenomena.* 188 (2013) 17–25. doi:10.1016/j.elspec.2012.09.004.
- [28] P. Glatzel, U. Bergmann, High resolution 1s core hole X-ray spectroscopy in 3d transition metal complexes — electronic and structural information, *Coord. Chem. Rev.* 249 (2005) 65–95. doi:10.1016/j.ccr.2004.04.011.
- [29] F. de Groot, G. Vankó, P. Glatzel, The 1s x-ray absorption pre-edge structures in transition metal oxides., *J. Phys. Condens. Matter.* 21 (2009) 104207. doi:10.1088/0953-8984/21/10/104207.
- [30] H. Yamaoka, M. Oura, M. Taguchi, T. Morikawa, K. Takahiro, A. Terai, K. Kawatsura, A. M. Vlaicu, Y. Ito, T. Mukoyama, $K\beta$ Resonant X-ray Emission Spectroscopy for Fe, Fe_2O_3 and Fe_3O_4 , *J. Phys. Soc. Japan.* 73 (2004) 3182–3191. doi:10.1143/JPSJ.73.3182.
- [31] L.D. Landau, J.M. Lifszyc, *Mechanika kwantowa*, 3rd ed., Warszawa, 2012.
- [32] J.J. Sakurai, *Advanced Quantum Mechanics*, Addison-Wesley Publishing Co., New York, 1967.
- [33] J. Szlachetko, M. Nachtegaal, J. Sá, J. Dousse, J. Hoszowska, E. Kleymentov, M. Janousch, O. Safonova, C. König, J. van Bokhoven, High energy resolution off-resonant spectroscopy at sub-second time resolution: $(Pt(acac)_2)$ decomposition, *Chem. Commun.* 48 (2012) 10898–10900. doi:10.1039/c2cc35086f.
- [34] M. Nowakowski, J. Czapla-Masztafiak, J. Szlachetko, W.M. Kwiatek, Electronic structure of Fe, α - Fe_2O_3 and $Fe(NO_3)_3 \times 9 H_2O$ determined using RXES, *Chem. Phys.* 493 (2017) 49–55. doi:10.1016/j.chemphys.2017.06.002.
- [35] A. Kotani, S. Shin, Resonant inelastic x-ray scattering spectra for electrons in solids,

Rev. Mod. Phys. 73 (2001) 203–246. doi:10.1103/RevModPhys.73.203.

- [36] F.M.F. De Groot, P. Glatzel, U. Bergmann, P.A. Van Aken, R.A. Barrea, S. Klemme, M. Hävecker, A. Knop-Gericke, W.M. Heijboer, B.M. Weckhuysen, 1s2p Resonant inelastic X-ray scattering of iron oxides, *J. Phys. Chem. B.* 109 (2005) 20751–20762. doi:10.1021/jp054006s.
- [37] J. Tulkki, T. Aberg, Behaviour of Raman resonance scattering across the K x-ray absorption edge, *J. Phys. B At. Mol.* 15 (1982) L435–L440. doi:10.1088/0022-3700/15/13/004.
- [38] F. Sette, G. Ruocco, M. Krisch, U. Bergmann, C. Masciovecchio, V. Mazzacurati, G. Signorelli, R. Verbeni, Collective dynamics in water by high energy resolution inelastic X-Ray scattering, *Phys. Rev. Lett.* 75 (1995) 850–853. doi:10.1103/PhysRevLett.75.850.
- [39] A.Q.R. Baron, Y. Tanaka, S. Goto, K. Takeshita, T. Matsushita, T. Ishikawa, An X-ray scattering beamline for studying dynamics, *J. Phys. Chem. Solids.* 61 (2000) 461–465. doi:10.1016/S0022-3697(99)00337-6.
- [40] J. Szlachetko, M. Nachtegaal, E. De Boni, M. Willmann, O. Safonova, J. Sa, G. Smolentsev, M. Szlachetko, J.A. Van Bokhoven, J.C. Dousse, J. Hozzowska, Y. Kayser, P. Jagodzinski, A. Bergamaschi, B. Schmitt, C. David, A. Lücke, A von Hamos x-ray spectrometer based on a segmented-type diffraction crystal for single-shot x-ray emission spectroscopy and time-resolved resonant inelastic x-ray scattering studies, *Rev. Sci. Instrum.* 83 (2012) 103105–1 – 103105–7. doi:10.1063/1.4756691.
- [41] T. Gog, D.M. Casa, A.H. Said, M.H. Upton, J. Kim, I. Kuzmenko, X. Huang, R. Khachatryan, Spherical analyzers and monochromators for resonant inelastic hard X-ray scattering: A compilation of crystals and reflections, *J. Synchrotron Radiat.* 20 (2013) 74–79. doi:10.1107/S0909049512043154.
- [42] H.H. Johann, Die Erzeugung lichtstarker Rontgenspektren mit Hilfe von Konkavkristallen, *Zeitschrift für Phys.* 69 (1931) 185–206. doi:10.1007/BF01798121.
- [43] J.W.M. DuMond, CRYSTAL DIFFRACTION SPECTROSCOPY OF NUCLEAR γ -RAYS, in: K. SIEGBAHN (Ed.), BETA- GAMMA-RAY Spectrosc., NORTH-HOLLAND PUBLISHING COMPANY, Amsterdam, 1955: p. 105.
- [44] T. Johansson, Über ein neuartiges, genau fokussierendes Rontgenspektrometer - Erste Mitteilung, *Zeitschrift für Phys.* 82 (1933) 507–528. doi:10.1007/BF01342254.
- [45] J. Sá, J. Czaplá-Masztafiak, E. Lipiec, Y. Kayser, W. Kwiatek, B. Wood, G.B. Deacon, G. Berger, F. Dufrasne, D.L.A. Fernandes, J. Szlachetko, The use of Resonant X-ray

- Emission Spectroscopy (RXES) for the electronic analysis of metal complexes and their interactions with biomolecules, *Drug Discov. Today Technol.* 16 (2015) 1–6. doi:10.1016/j.ddtec.2015.07.001.
- [46] J. Sá, J. Czapla-Masztafiak, E. Lipiec, Y. Kayser, D.L.A. Fernandes, J. Szlachetko, F. Dufresne, G. Berger, Resonant X-ray emission spectroscopy of platinum(II) anticancer complexes, *Analyst.* 141 (2016) 1226–1232. doi:10.1039/C5AN02490K.
- [47] J. Szlachetko, J. Sá, Rational design of oxynitride materials: From theory to experiment, *CrystEngComm.* 15 (2013) 2583–2587. doi:10.1039/c3ce26909d.
- [48] R. Alonso-Mori, J. Kern, D. Sokaras, T. Weng, D. Nordlund, R. Tran, J. Delor, V.K. Yachandra, J. Yano, U. Bergmann, A multi-crystal wavelength dispersive x-ray spectrometer A multi-crystal wavelength dispersive x-ray spectrometer, *Rev. Sci. Instrum.* 83 (2012). doi:10.1063/1.4737630.
- [49] K. Zakrzewska, K. Kollbek, M. Sikora, C. Kapusta, J. Szlachetko, M. Sitarz, M. Ziabka, M. Radecka, Importance of the electronic structure of modified TiO₂ in the photoelectrochemical processes of hydrogen generation, *Int. J. Hydrogen Energy.* 40 (2015) 815–824. doi:10.1016/j.ijhydene.2014.09.097.
- [50] C.J. Milne, T.J. Penfold, M. Chergui, Recent experimental and theoretical developments in time-resolved X-ray spectroscopies, *Coord. Chem. Rev.* 277–278 (2014) 44–68. doi:10.1016/j.ccr.2014.02.013.
- [51] T. Ressler, WinXAS: a Program for X-ray Absorption Spectroscopy Data Analysis under MS-Windows, *J. Synchrotron Rad.* 5 (1998) 118–122.
- [52] A. Kuzmin, EDA: EXAFS data analysis software package, *Phys. B Phys. Condens. Matter.* 208–209 (1995) 175–176. doi:10.1016/0921-4526(94)00663-G.
- [53] B. Ravel, M. Newville, ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: Data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT, *J. Synchrotron Radiat.* 12 (2005) 537–541. doi:10.1107/S0909049505012719.
- [54] T.E. Westre, A. Di Cicco, A. Filipponi, C.R. Natoli, B. Hedman, E.I. Solomon, K.O. Hodgson, GNXAS, a Multiple-Scattering Approach to EXAFS Analysis: Methodology and Applications to Iron Complexes, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 1566–1583. doi:10.1021/ja00110a012.
- [55] J.J. Rehr, J.J. Kas, F.D. Vila, M.P. Prange, K. Jorissen, Parameter-free calculations of X-ray spectra with FEFF9, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 12 (2010) 5503. doi:10.1039/b926434e.
- [56] O. Bunău, Y. Joly, Self-consistent aspects of x-ray absorption calculations, *J. Phys.*

Condens. Matter. 21 (2009). doi:10.1088/0953-8984/21/34/345501.

- [57] M. Newville, P. Livin, Y. Yacoby, J.J. Rehr, E.A. Stern, Near-edge x-ray-absorption fine structure of Pb: A comparison of theory and experiment, *Phys. Rev. B.* 47 (1993) 14126–14131. doi:10.1103/PhysRevB.47.14126.
- [58] B. Ravel, Linear combination fitting: Interpreting data as a mixture of standards, *Athena Users' Guid.* (n.d.). <http://bruceravel.github.io/demeter/aug/analysis/lcf.html> (accessed August 27, 2018).
- [59] A.L. Ankudinov, Y. Takimoto, J.J. Rehr, Combined Bethe-Salpeter equations and time-dependent density-functional theory approach for x-ray absorption calculations, *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.* 71 (2005) 1–8. doi:10.1103/PhysRevB.71.165110.
- [60] J.J. Rehr, J.J. Kas, F.D. Vila, M.P. Prange, K. Jorissen, Parameter-free calculations of X-ray spectra with FEFF9, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 12 (2010) 5503–5513. doi:10.1039/b926434e.
- [61] A. Ankudinov, B. Ravel, Real-space multiple-scattering calculation and interpretation of x-ray-absorption near-edge structure, *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.* 58 (1998) 7565–7576. doi:10.1103/PhysRevB.58.7565.
- [62] J.J. Rehr, Theoretical approaches to x-ray absorption fine structure, *Rev. Mod. Phys.* 72 (2000) 621–654. doi:10.1103/RevModPhys.72.621.
- [63] J.J. Kas, J.J. Rehr, J.A. Soininen, P. Glatzel, Real Space Green's Function Approach to RIXS, (2011) 1–22. <http://arxiv.org/abs/1101.4248>.
- [64] T. Ahmed, J. Kas, J. Rehr, Hubbard model corrections in real-space x-ray spectroscopy theory, *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.* 85 (2012) 1–9. doi:10.1103/PhysRevB.85.165123.
- [65] J.J. Rehr, J.J. Kas, F.D. Vila, Wykład prof. Johna J. Rehra na Stanford University w ramach TIMES Lecture Series, Real-Sp. Mult. Theory EXAFS XANES FEFF. (2017). https://web.stanford.edu/group/times/images/II-Real-spaceMSTheory_TIMES1-17.pdf (accessed August 27, 2018).
- [66] J.J. Rehr, R.C. Albers, Scattering-matrix formulation of curved-wave multiple-scattering theory: Application to x-ray-absorption fine structure, *Phys. Rev. B.* 41 (1990) 8139–8149. doi:10.1103/PhysRevB.41.8139.
- [67] M.J. Berger, J.H. Hubbell, S.M. Seltzer, J. Chang, J.S. Coursey, R. Sukumar, D.S. Zucker, K. Olsen, NIST Standard Reference Database 8 (XGAM), (2010).
- [68] T. Rehren, T. Belgya, A. Jambon, G. Káli, Z. Kasztovszky, Z. Kis, I. Kovács, B. Maróti,

- M. Martín-Torres, G. Miniaci, V.C. Pigott, M. Radivojević, L. Rosta, L. Szentmiklósi, Z. Szokefalvi-Nagy, 5,000 years old Egyptian iron beads made from hammered meteoritic iron, *J. Archaeol. Sci.* 40 (2013) 4785–4792. doi:10.1016/j.jas.2013.06.002.
- [69] S. Polizzi, M. Ferrara, M. Bugiani, D. Barbero, T. Baccolo, Aluminium and iron air pollution near an iron casting and aluminium foundry in Turin district (Italy), *J. Inorg. Biochem.* 101 (2007) 1339–1343. doi:10.1016/j.jinorgbio.2007.06.012.
- [70] J.W. Peters, J.W. Peters, W.N. Lanzilotta, B.J. Lemon, L.C. Seefeldt, X-ray Crystal Structure of the Fe-Only Hydrogenase (CpI) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 Angstrom Resolution, *Science*. 282 (1998) 1853–1859. doi:10.1126/science.282.5395.1853.
- [71] K. Jomova, S. Baros, M. Valko, Redox active metal-induced oxidative stress in biological systems, *Transit. Met. Chem.* 37 (2012) 127–134. doi:10.1007/s11243-012-9583-6.
- [72] W.H. Koppenol, The Haber-Weiss cycle – 70 years later, *Redox Rep.* 6 (2001) 229–234. doi:10.1179/135100001101536373.
- [73] N.N. Greenwood, A. Earnshaw, *Chemistry of the elements*, 2nd ed., Butterworth-Heinemann, 1995. doi:10.1016/S0277-5387(00)84180-7.
- [74] J. Li, K.B. Nam, M.L. Nakarmi, J.Y. Lin, H.X. Jiang, P. Carrier, S.H. Wei, Band structure and fundamental optical transitions in wurtzite AlN, *Appl. Phys. Lett.* 83 (2003) 5163–5165. doi:10.1063/1.1633965.
- [75] O. Neufeld, M.C. Toroker, Can we judge an oxide by its cover? The case of platinum over α -Fe₂O₃ from first principles, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17 (2015) 24129–24137. doi:10.1039/C5CP04314J.
- [76] L. Dghoughi, B. Elidrissi, C. Bernede, M. Addou, M.A. Lamrani, M. Regragui, H. Erguig, Physico-chemical, optical and electrochemical properties of iron oxide thin films prepared by spray pyrolysis, *Appl. Surf. Sci.* 253 (2006) 1823–1829. doi:10.1016/j.apsusc.2006.03.021.
- [77] C. Xia, Y. Jia, M. Tao, Q. Zhang, Tuning the band gap of hematite α -Fe₂O₃ by sulfur doping, *Phys. Lett. Sect. A Gen. At. Solid State Phys.* 377 (2013) 1943–1947. doi:10.1016/j.physleta.2013.05.026.
- [78] A.K. Ramasami, T.N. Ravishankar, K. Sureshkumar, M.V. Reddy, B.V.R. Chowdari, T. Ramakrishnappa, G.R. Balakrishna, Synthesis, Exploration of Energy Storage and Electrochemical Sensing Properties of Hematite Nanoparticles, *J. Alloys Compd.* 671 (2016) 552–559. doi:10.1016/j.jallcom.2016.02.050.

- [79] A.A. Akl, Optical properties of crystalline and non-crystalline iron oxide thin films deposited by spray pyrolysis, *Appl. Surf. Sci.* 233 (2004) 307–319. doi:10.1016/j.apsusc.2004.03.263.
- [80] A. Kay, I. Cesar, M. Grätzel, New benchmark for water photooxidation by nanostructured α -Fe₂O₃ films, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 15714–15721. doi:10.1021/ja064380l.
- [81] Q.A. Pankhurst, C.E. Johnson, M.F. Thomas, A Mossbauer study of magnetic phase transitions in α -Fe₂O₃ crystals, *J. Phys. C Solid State Phys.* 19 (1986) 7081–7098. doi:10.1088/0022-3719/19/35/018.
- [82] M. Wilke, F. Farges, P.E. Petit, G.E. Brown, F. Martin, Oxidation state and coordination of Fe in minerals: An FeK- XANES spectroscopic study, *Am. Mineral.* 86 (2001) 714–730. doi:10.2138/am-2001-5-612.
- [83] M. Wilke, G.M. Partzsch, R. Bernhardt, D. Lattard, Determination of the iron oxidation state in basaltic glasses using XANES at the K-edge, *Chem. Geol.* 213 (2004) 71–87. doi:10.1016/j.chemgeo.2004.08.034.
- [84] J. Czapla-Masztafiak, G.J. Lis, M. Gajda, E. Jasek, U. Czubek, F. Bolechała, C. Borca, W.M. Kwiatek, Determination of oxidation state of iron in normal and pathologically altered human aortic valves, *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms.* 364 (2014) 70–75. doi:10.1016/j.nimb.2015.04.026.
- [85] A. Svyazhin, E. Kurmaev, E. Shreder, S. Shamin, C.J. Sahle, Local moments and electronic correlations in Fe-based Heusler alloys: K α x-ray emission spectra measurements, *J. Alloys Compd.* 679 (2016) 268–276. doi:10.1016/j.jallcom.2016.04.041.
- [86] J. Szlachetko, M. Nachtegaal, E. De Boni, M. Willmann, O. Safonova, J. Sá, G. Smolentsev, M. Szlachetko, J.A. Van Bokhoven, J.C. Dousse, J. Hoszowska, Y. Kayser, P. Jagodzinski, A. Bergamaschi, B. Schmitt, C. David, A. Lücke, A von Hamos x-ray spectrometer based on a segmented-type diffraction crystal for single-shot x-ray emission spectroscopy and time-resolved resonant inelastic x-ray scattering studies, *Rev. Sci. Instrum.* 83 (2012) 0–7. doi:10.1063/1.4756691.
- [87] Dzięki uprzejmości dr hab. Marcina Sikory, *RXES_GUI*, (2015).
- [88] A.M. Turner, A.W. Donoho, J.L. Erskine, Experimental bulk electronic properties of ferromagnetic iron, *Phys. Rev. B.* 29 (1984) 2986–3000. doi:10.1103/PhysRevB.29.2986.
- [89] M. Nowakowski, J. Czapla-Masztafiak, J. Szlachetko, W.M. Kwiatek, Electronic

- structure of Fe, α -Fe₂O₃ and Fe(NO₃)₃ × 9 H₂O determined using RXES, *Chem. Phys.* 493 (2017) 49–55. doi:10.1016/j.chemphys.2017.06.002.
- [90] B. Ravel, *ATOMS: Crystallography for the X-ray absorption spectroscopist*, *J. Synchrotron Radiat.* 8 (2001) 314–316. doi:10.1107/S090904950001493X.
- [91] N.J. Hair, J.K. Beattie, Structure of hexaaquairon(III) nitrate trihydrate. Comparison of iron(II) and iron(III) bond lengths in high-spin octahedral environments, *Inorg. Chem.* 16 (1977) 9–14. doi:10.1021/ic50168a006.
- [92] M.A. Van Hove, J.J. Rehr, W. Schattke, Development of the scattering theory of X-ray absorption and core level photoemission, *J. Electron Spectros. Relat. Phenomena.* 126 (2002) 67–76.
- [93] J. Stöhr, Analysis of K-Shell Excitation Spectra by Curve Fitting, in: H.K. V. Lotsch, G. Ertl, R. Gomer, D.L. Mills (Eds.), *NEXAFS Spectrosc.*, 2nd ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, 1996: pp. 211–238. doi:10.1007/978-3-662-02853-7.
- [94] K. Gajda-Schranz, S. Tymen, F. Boudoire, R. Toth, D.K. Bora, W. Calvet, M. Gratzel, E.C. Constable, A. Braun, Formation of an electron hole doped film in the α -Fe₂O₃ photoanode upon electrochemical oxidation, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15 (2013) 1443–1451. doi:10.1039/C2CP42597A.
- [95] T.K. Sham, L-edge x-ray-absorption systematics of the noble metals Rh, Pd, and Ag and the main-group metals In and Sn: A study of the unoccupied density of states in 4d elements, *Phys. Rev. B.* 31 (1985) 1888–1902. doi:10.1103/PhysRevB.31.1888.
- [96] G. Abhandlung, *Structural and electronic properties of transition metal nanoalloys and magnetic compounds*, Universitat Bayreuth, 2013.
- [97] A.A. Sapozhnik, C. Luo, H. Ryll, F. Radu, M. Jourdan, H. Zabel, H.J. Elmers, Experimental determination of exchange constants in antiferromagnetic Mn₂Au, *Phys. Rev. B.* 97 (2018). doi:10.1103/PhysRevB.97.184416.
- [98] M.G. Erkkinen, M. Kim, M.D. Geschwind, *Major Neurodegenerative Diseases*, Cold Spring Harb. *Perspect. Biol.* (2017). doi:10.1101/cshperspect.a033118.
- [99] C. Chen, X.-P. Dong, Epidemiological characteristics of human prion diseases, *Infect. Dis. Poverty.* 5 (2016) 47. doi:10.1186/s40249-016-0143-8.
- [100] F. Chiti, C.M. Dobson, Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade, *Annu. Rev. Biochem.* 86 (2017) 27–68. doi:10.1146/annurev-biochem-061516-045115.
- [101] V.N. Uversky, A. Fink, *Protein Misfolding, Aggregation and Conformational Diseases: Part B: Molecular Mechanisms of Conformational Diseases*, Springer, 2007.

- [102] M. Nowakowski, J. Czapla-Masztafiak, I. Zhukov, L. Zhukova, M. Kozak, W.M. Kwiatek, Electronic properties of a PrPC–Cu(II) complex as a marker of 5-fold Cu (II) coordination †, *Metallomics*. (2019). doi:10.1039/c8mt00339d.
- [103] G. Ilc, G. Giachin, M. Jaremko, Ł. Jaremko, F. Benetti, J. Plavec, I. Zhukov, G. Legname, NMR structure of the human prion protein with the pathological Q212P mutation reveals unique structural features, *PLoS One*. 5 (2010) 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0011715.
- [104] N.J. Cobb, W.K. Surewicz, Prion Diseases and Their Biochemical Mechanisms, *Biochemistry*. 48 (2009) 2574–2585. doi:10.1021/bi900108v.Prion.
- [105] G.L. Millhauser, Copper and the Prion Protein: Methods, Structures, Function, and Disease, *Annu Rev Phys Chem*. 58 (2007) 299–320. doi:10.1146/annurev.physchem.58.032806.104657.Copper.
- [106] S. Morante, R. Gonza, C. Potrich, C. Meneghini, W. Meyer-klaucke, G. Menestrina, Inter- and Intra-octarepeat Cu(II) Site Geometries in the Prion Protein, *J. Biol. Chem*. 279 (2004) 11753–11759. doi:10.1074/jbc.M312860200.
- [107] M. Chattopadhyay, E.D. Walter, D.J. Newell, P.J. Jackson, E. Aronoff-Spencer, J. Peisach, G.J. Gerfen, B. Bennett, W.E. Antholine, G.L. Millhauser, The octarepeat domain of the prion protein binds Cu(II) with three distinct coordination modes at pH 7.4, *J. Am. Chem. Soc*. 127 (2005) 12647–12656. doi:10.1021/ja053254z.
- [108] C.S. Burns, E. Aronoff-Spencer, C.M. Dunham, P. Lario, N.I. Avdievich, W.E. Antholine, M.M. Olmstead, A. Vrieling, G.J. Gerfen, J. Peisach, W.G. Scott, G.L. Millhauser, Molecular Features of the Copper Binding Sites in the Octarepeat Domain of the Prion Protein, *Biochemistry*. 41 (2002) 3991–4001. doi:10.1021/bi011922x.
- [109] J. Stöckel, J. Safar, A.C. Wallace, F.E. Cohen, S.B. Prusiner, Prion protein selectively binds copper(II) ions, *Biochemistry*. 37 (1998) 7185–7193. doi:10.1021/bi972827k.
- [110] G.L. Millhauser, Copper binding in the prion protein., *Acc Chem Res*. 37 (2004) 79–85. doi:10.1021/ar0301678.
- [111] I. V. Baskakov, O. V. Bocharova, In vitro conversion of mammalian prion protein into amyloid fibrils displays unusual features, *Biochemistry*. 44 (2005) 2339–2348. doi:10.1021/bi048322t.
- [112] G. Giachin, P.T. Mai, T.H. Tran, G. Salzano, F. Benetti, V. Migliorati, A. Arcovito, S. Della Longa, G. Mancini, P.D. Angelo, G. Legname, The non-octarepeat copper binding site of the prion protein is a key regulator of prion conversion, *Nat. Sci. Reports*. 5 (2015) 1–14. doi:10.1038/srep15253.

- [113] O. V. Bocharova, L. Breydo, V. V. Salnikov, I. V. Baskakov, Copper(II) inhibits in vitro conversion of prion protein into amyloid fibrils, *Biochemistry*. 44 (2005) 6776–6787. doi:10.1021/bi050251q.
- [114] D.J. Stevens, E.D. Walter, A. Rodríguez, D. Draper, P. Davies, D.R. Brown, G.L. Millhauser, Early onset prion disease from octarepeat expansion correlates with copper binding properties, *PLoS Pathog*. 5 (2009). doi:10.1371/journal.ppat.1000390.
- [115] K. Wuthrich, R. Riek, Three-dimensional structures of prion proteins, *Adv. Protein Chem*. 57 (2001) 55–82.
- [116] C.L. Haigh, K. Edwards, D.R. Brown, Copper binding is the governing determinant of prion protein turnover, *Mol. Cell. Neurosci*. 30 (2005) 186–196. doi:10.1016/j.mcn.2005.07.001.
- [117] A. Marín-Moreno, N. Fernández-Borges, J.C. Espinosa, O. Andréoletti, J.M. Torres, Transmission and Replication of Prions, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci*. 150 (2017) 181–201. doi:10.1016/bs.pmbts.2017.06.014.
- [118] K.M. Pan, M. Baldwin, J. Nguyen, M. Gasset, A. Serban, D. Groth, I. Mehlhorn, Z. Huang, R.J. Fletterick, F.E. Cohen, Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins., *Proc. Natl. Acad. Sci*. 90 (1993) 10962–10966. doi:10.1073/pnas.90.23.10962.
- [119] H. Erana, V. Venegas, J. Moreno, J. Castilla, Prion-like disorders and Transmissible Spongiform Encephalopathies: An overview of the mechanistic features that are shared by the various disease-related misfolded proteins, *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 483 (2016) 1125–1136. doi:10.1016/j.bbrc.2016.08.166.
- [120] M.J. Ford, L.J. Burton, R.J. Morris, S.M. Hall, SELECTIVE EXPRESSION OF PRION PROTEIN IN PERIPHERAL TISSUES OF THE ADULT MOUSE, *Neuroscience*. 113 (2002) 177–192. doi:dx.doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00155-0.
- [121] J. Herms, T. Tings, S. Gall, A. Madlung, A. Giese, H. Siebert, P. Schürmann, O. Windl, N. Brose, H. Kretzschmar, Evidence of presynaptic location and function of the prion protein., *J. Neurosci*. 19 (1999) 8866–8875. doi:10.1523/JNEUROSCI.19-20-08866.1999.
- [122] J. Laurén, D.A. Gimbel, H.B. Nygaard, J.W. Gilbert, M. Stephen, Cellular Prion Protein Mediates Impairment of Synaptic Plasticity by Amyloid- β Oligomers, *Nature*. 457 (2009) 1128–1132. doi:10.1038/nature07761.Cellular.
- [123] D. Rial, T.C. Piermartiri, F.S. Duarte, C.I. Tasca, R. Walz, R.D. Prediger, OVEREXPRESSION OF CELLULAR PRION PROTEIN (PRP C) PREVENTS

COGNITIVE DYSFUNCTION AND APOPTOTIC NEURONAL CELL DEATH INDUCED BY AMYLOID- b (A B 1 – 40) ADMINISTRATION IN MICE, *Neuroscience*. 215 (2012) 79–89. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.04.034.

- [124] S. V. Salazar, S.M. Strittmatter, Cellular prion protein as a receptor for amyloid-?? oligomers in Alzheimer's disease, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 483 (2016) 1143–1147. doi:10.1016/j.bbrc.2016.09.062.
- [125] C. Peters, M.P. Espinoza, S. Gallegos, C. Opazo, L.G. Aguayo, Alzheimer's A β interacts with cellular prion protein inducing neuronal membrane damage and synaptotoxicity, *Neurobiol. Aging*. 36 (2015) 1369–1377. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2014.11.019.
- [126] D.R. Brown, W.J. Schulz-Schaeffer, B. Schmidt, H.A. Kretzschmar, Prion Protein-Deficient Cells Show Altered Response to Oxidative Stress Due to Decreased SOD-1 Activity, *Exp. Neurol.* 146 (1997) 104–112. doi:10.1006/exnr.1997.6505.
- [127] M. Daniels, D.R. Brown, Purification and preparation of prion protein: synaptic superoxide dismutase., *Methods Enzymol.* 349 (2002) 258–67. doi:10.1016/S0076-6879(02)49340-8.
- [128] C. Sánchez-López, C.O. Fernández, L. Quintanar, Neuroprotective alpha-cleavage of the human prion protein significantly impacts Cu(II) coordination at its His111 site, *Dalt. Trans.* 47 (2018) 9274–9282. doi:10.1039/C7DT03400H.
- [129] O. Kuhn, Science Break: Prions, *CSEG Rec.* 40 (2015).
- [130] S. Furlan, G. La Penna, Ab initio simulations of Cu binding sites on the N-terminal region of prion protein, *J Biol Inorg Chem.* 12 (2007) 571–583. doi:10.1007/s00775-007-0218-x.
- [131] C. Migliorini, E. Porciatti, M. Luczkowski, D. Valensin, Structural characterization of Cu $^{2+}$, Ni $^{2+}$ and Zn $^{2+}$ binding sites of model peptides associated with neurodegenerative diseases, *Coord. Chem. Rev.* 256 (2012) 352–368. doi:10.1016/j.ccr.2011.07.004.
- [132] S. Furlan, E.M. Sol, Studying the Cu binding sites in the PrP N- terminal region : A test case for ab initio simulations a test case for ab initio simulations, *Eur. Biophys. J.* 36 (2007). doi:10.1007/s00249-007-0162-2.
- [133] A. McDonald, M.J. Pushie, G.L. Millhauser, G.N. George, New insights into metal interactions with the prion protein: EXAFS analysis and structure calculations of copper binding to a single octarepeat from the prion protein, *J. Phys. Chem. B.* 117 (2013) 13822–13841. doi:10.1021/jp408239h.
- [134] M.J. Pushie, K.H. Nienaber, A. McDonald, G.L. Millhauser, G.N. George, Combined EXAFS and DFT structure calculations provide structural insights into the 1:1 multi-

- histidine complexes of Cu(II) , Cu(I) , and Zn(II) with the tandem octarepeats of the mammalian prion protein, *Chemistry*. 20 (2014) 9770–9783. doi:10.1002/chem.201304201.
- [135] E.D. Walter, D.J. Stevens, A.R. Spevacek, M.P. Visconte, A. Dei Rossi, G.L. Millhauser, Copper binding extrinsic to the octarepeat region in the prion protein., *Curr. Protein Pept. Sci.* 10 (2009) 529–35. doi:10.1016/j.neuroimage.2012.01.013.
- [136] F. Stellato, V. Minicozzi, G.L. Millhauser, M. Pascucci, O. Proux, G.C. Rossi, A. Spevacek, S. Morante, Copper – zinc cross - modulation in prion protein binding, *Eur Biophys J.* 43 (2014) 631–642. doi:10.1007/s00249-014-0993-6.
- [137] E.D. Walter, D.J. Stevens, M.P. Visconte, G.L. Millhauser, The Prion Protein is a Combined Zinc and Copper Binding Protein: Zn²⁺ Alters the Distribution of Cu²⁺ Coordination Modes, *J Am Chem Soc.* 129 (2007) 15440–15441. doi:10.1021/ja077146j.The.
- [138] M. Morillas, W. Swietnicki, P. Gambetti, W.K. Surewicz, Membrane environment alters the conformational structure of the recombinant human prion protein, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 36859–36865. doi:10.1074/jbc.274.52.36859.
- [139] G.N. George, I.J. Pickering, M. Jake Pushie, K. Nienaber, M.J. Hackett, I. Ascone, B. Hedman, K.O. Hodgson, J.B. Aitken, A. Levina, C. Glover, P.A. Lay, X-ray-induced photo-chemistry and X-ray absorption spectroscopy of biological samples, *J. Synchrotron Radiat.* 19 (2012) 875–886. doi:10.1107/S090904951203943X.
- [140] P. Deschamps, P.P. Kulkarni, B. Sarkar, X-ray Structure of Physiological Copper (II) – Bis (L -histidinato) Complex, 43 (2004) 3338–3340.
- [141] M. Nowakowski, J. Czaplá-Masztafiak, M. Kozak, I. Zhukov, L. Zhukova, J. Szlachetko, W.M. Kwiatek, Preliminary results of human PrP^C protein studied by spectroscopic techniques, *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms.* 411 (2017) 121–128. doi:10.1016/j.nimb.2017.06.022.
- [142] Y. Du, Y. Zhu, S. Xi, P. Yang, H.O. Moser, M.B.H. Breese, A. Borgna, XAFCA: A new XAFS beamline for catalysis research, *J. Synchrotron Radiat.* 22 (2015) 839–843. doi:10.1107/S1600577515002854.
- [143] P. Khemthong, P. Photai, N. Gridanurak, Structural properties of CuO / TiO₂ nanorod in relation to their catalytic activity for simultaneous hydrogen production under solar light, *Int. J. Hydrogen Energy.* 38 (2014) 15992–16001. doi:10.1016/j.ijhydene.2013.10.065.
- [144] T. Yokoyama, N. Kosugi, H. Kuroda, Polarized xanes spectra of CuCl₂· 2H₂O. Further

- evidence for shake-down phenomena, *Chem. Phys.* 103 (1986) 101–109. doi:10.1016/0301-0104(86)85106-0.
- [145] R.A. Bair, W.A. Goddard, Ab initio studies of the x-ray absorption edge in copper complexes. I. Atomic Cu²⁺ and Cu(II)Cl₂, *Phys. Rev. B.* 22 (1980) 2767–2776. doi:10.1103/PhysRevB.22.2767.
- [146] M.D. Hanwell, D.E. Curtis, D.C. Lonie, T. Vandermeersch, E. Zurek, G.R. Hutchison, Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform, *J. Cheminform.* 4 (2012) 1–17. doi:10.1186/1758-2946-4-17.
- [147] A.K. Rappe, C.J. Casewit, K.S. Colwell, W.A. Goddard III, W.M. Skiff, UFF, a full periodic table force field for molecular mechanics and molecular dynamics simulations, *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 10024–10035. doi:10.1021/ja00051a040.
- [148] D.B. Boyd, R.D. Coner, Stochastic approach to force field evaluations : conformational analysis of raloxifene , a potential new therapeutic agent for post-menopausal osteoporosis, *J. Mol. Struct.* 368 (1996) 7–15. doi:10.1016/S0166-1280(96)90525-4.
- [149] L. Denadai, J.M. Resende, F.B. De Sousa, I. Lula, R.A.S. Santos, Study of angiotensin- (1 – 7) vasoactive peptide and its β -cyclodextrin inclusion complexes : Complete sequence-specific NMR assignments and structural studies, *Peptides.* 28 (2007) 2199–2210. doi:10.1016/j.peptides.2007.08.011.
- [150] M.P. Gleeson, D. Gleeson, QM/MM calculations in drug discovery: A useful method for studying binding phenomena?, *J. Chem. Inf. Model.* 49 (2009) 670–677. doi:10.1021/ci800419j.
- [151] S. Le Roux, V. Petkov, ISAACS-interactive structure analysis of amorphous and crystalline systems, *J. Appl. Crystallogr.* 43 (2010) 181–185. doi:10.1107/S0021889809051929.
- [152] L. Quintanar, L. Rivillas-Acevedo, R. Grande-Aztatzi, C.Z. Gomez-Castro, T. Arcos-Lopez, A. Vela, Copper coordination to the prion protein: Insights from theoretical studies, *Coord. Chem. Rev.* 257 (2013) 429–444. doi:10.1016/j.ccr.2012.06.026.
- [153] L. Hedin, S. Lundqvist, Effects of Electron-Electron and Electron-Phonon Interactions on the One-Electron States of Solids, in: F. Seitz, D. Turnbull, H. Ehrenreich (Eds.), *Solid State Phys.*, Academic Press, Chalmers University of Technology, Göteborg, Sweden, 1969: pp. 1–181. doi:10.1016/S0081-1947(08)60615-3.
- [154] L. Hedin, B.I. Lundqvist, Explicit local exchange-correlation potentials, *J. Phys. C Solid State Phys.* 4 (1971) 2064–2083. doi:10.1088/0022-3719/4/14/022.
- [155] Y.H. Zhao, M.H. Abraham, A.M. Zissimos, Fast calculation of van der Waals volume as

- a sum of atomic and bond contributions and its application to drug compounds., *J. Org. Chem.* 68 (2003) 7368–7373. doi:10.1021/jo034808o.
- [156] A. Bondi, van der Waals Volumes and Radii, *J. Phys. Chem.* 68 (1964) 441–451. doi:10.1021/j100785a001.
- [157] A. Rana, D. Gnaneswari, S. Bansal, B. Kundu, Prion metal interaction: Is prion pathogenesis a cause or a consequence of metal imbalance?, *Chem. Biol. Interact.* 181 (2009) 282–291. doi:10.1016/j.cbi.2009.07.021.
- [158] M. Klewpatinond, P. Davies, S. Bowen, D.R. Brown, J.H. Viles, Deconvoluting the Cu²⁺ binding modes of full-length prion protein, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 1870–1881. doi:10.1074/jbc.M708472200.
- [159] E. Nittinger, N. Schneider, G. Lange, M. Rarey, Evidence of water molecules - A statistical evaluation of water molecules based on electron density, *J. Chem. Inf. Model.* 55 (2015) 771–783. doi:10.1021/ci500662d.
- [160] L. Gala, M. Lawson, K. Jomova, L. Zelenicky, A. Congradyova, M. Mazur, M. Valko, EPR Spectroscopy of a Clinically Active (1:2) Copper(ii)-Histidine Complex Used in the Treatment of Menkes Disease: A Fourier Transform Analysis of a Fluid CW-EPR Spectrum, *Molecules.* 19 (2014) 980–991. doi:10.3390/molecules19010980.
- [161] F. Neese, The ORCA program system, *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* 2 (2012) 73–78. doi:10.1002/wcms.81.
- [162] D. Denoyer, N. Perek, N. Le Jeune, D. Frere, F. Dubois, Evidence that ^{99m}Tc-(V)-DMSA uptake is mediated by NaPi cotransporter type III in tumour cell lines, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 31 (2004) 77–84. doi:10.1007/s00259-003-1334-7.
- [163] M.O. Krause, J.H. Oliver, Natural Widths of Atomic K and L Levels, Ka X - Ray Lines and Several KLL Auger Lines, *J. Chem. Phys. Ref. Data.* 8 (1979) 329–337. doi:10.1063/1.555595.
- [164] R. Zahn, C. Von Schroetter, K. Wüthrich, Human prion proteins expressed in *Escherichia* cell and purified by high-affinity column refolding, *FEBS Lett.* 417 (1997) 400–404. doi:10.1016/S0014-5793(97)01330-6.
- [165] Informacja uzyskana dzięki uprzejmości dr. Igora Zhukova, Warszawa, (2016).
- [166] C.H. Kjaergaard, M.F. Qayyum, S.D. Wong, F. Xu, G.R. Hemsworth, D.J. Walton, N.A. Young, G.J. Davies, P.H. Walton, K.S. Johansen, K.O. Hodgson, B. Hedman, E.I. Solomon, Spectroscopic and computational insight into the activation of O₂ by the mononuclear Cu center in polysaccharide monooxygenases, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111 (2014) 8797–8802. doi:10.1073/pnas.1408115111.

- [167] J.L. DuBois, P. Mukherjee, T.D.P. Stack, B. Hedman, E.I. Solomon, K.O. Hodgson, A Systematic K-edge X-ray Absorption Spectroscopic Study of Cu(III) Sites, *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000) 5775–5787. doi:10.1021/ja993134p.
- [168] J.J. Rehr, J.J. Kas, M.P. Prange, A.P. Sorini, Y. Takimoto, F. Vila, Ab initio theory and calculations of X-ray spectra, *Comptes Rendus Phys.* 10 (2009) 548–559. doi:10.1016/j.crhy.2008.08.004.
- [169] J.J. Rehr, A.L. Ankudinov, Solid state effects on X-ray absorption , emission and scattering processes, *Radiat. Phys. Chem.* 70 (2004) 453–463. doi:10.1016/j.radphyschem.2003.12.025.
- [170] T. Kim, B. Song, A.J.G. Lunt, G. Cibin, A.J. Dent, L. Lu, A.M. Korsunsky, In operando X-ray absorption spectroscopy study of charge rate effects on the atomic environment in graphene-coated Li-rich mixed oxide cathode, *Mater. Des.* 98 (2016) 231–242. doi:10.1016/j.matdes.2016.03.028.
- [171] M.C. Feiters, W. Meyer-Klaucke, X-ray Absorption Spectroscopy in Biology (BioXAS), in: R.R. Crichton, R.O. Louro (Eds.), *Pract. Approaches to Biol. Inorg. Chem.*, 1st ed., Elsevier B.V, 2013: pp. 131–160. doi:10.1016/B978-0-444-56351-4.00005-1.
- [172] C.H. Kjaergaard, M.F. Qayyum, S.D. Wong, F. Xu, G.R. Hemsworth, D.J. Walton, N.A. Young, G.J. Davies, P.H. Walton, K.S. Johansen, K.O. Hodgson, B. Hedman, E.I. Solomon, Spectroscopic and computational insight into the activation of O₂ by the mononuclear Cu center in polysaccharide monooxygenases, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111 (2014) 8797–8802. doi:10.1073/pnas.1408115111.
- [173] J. Das, A. Sarkar, P.C. Sil, Hexavalent chromium induces apoptosis in human liver (HepG2) cells via redox imbalance, *Toxicol. Reports.* 2 (2015) 600–608. doi:10.1016/j.toxrep.2015.03.013.
- [174] N. Farkas, M. Pesti, J. Belagyi, Effects of hexavalent chromium on the plasma membranes of sensitive and tolerant mutants of *Schizosaccharomyces pombe*. An EPR study, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1611 (2003) 217–222. doi:10.1016/S0005-2736(03)00055-5.
- [175] H. Espenson, Chemistry of Organochromium(III) Complexes, *Acc. Chem. Res.* 25 (1992) 222–227. doi:10.1021/ar00017a003.
- [176] J. Belagyi, M. Pas, P. Raspor, M. Pesti, T. P??li, Effect of hexavalent chromium on eukaryotic plasma membrane studied by EPR spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1421 (1999) 175–182. doi:10.1016/S0005-2736(99)00129-7.
- [177] Z. Huang, X. Kuang, Z. Chen, Z. Fang, S. Wang, P. Shi, Comparative studies of tri- and

- hexavalent chromium cytotoxicity and their effects on oxidative state of *saccharomyces cerevisiae* cells, *Curr. Microbiol.* 68 (2014) 448–456. doi:10.1007/s00284-013-0496-1.
- [178] D.D.D. Hepburn, J.M. Burney, S.A. Woski, J.B. Vincent, The nutritional supplement chromium picolinate generates oxidative DNA damage and peroxidized lipids in vivo, *Polyhedron*. 22 (2003) 455–463. doi:10.1016/S0277-5387(02)01369-4.
- [179] V. Ducros, Chromium metabolism, *Biol. Trace Elem. Res.* 32 (1992) 65–77. doi:10.1007/BF02784589.
- [180] A. Akbarzadeh, R. Rezaei-sadabady, S. Davaran, S.W. Joo, N. Zarghami, Liposome: classification, preparation, and applications, *Nanoscale Res. Lett.* 8 (2013) 102–111. doi:10.1186/1556-276X-8-102.
- [181] A. Laouini, C. Jaafar-Maalej, I. Limayem-Blouza, S. Sfar, C. Charcosset, H. Fessi, Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art, *J. Colloid Sci. Biotechnol.* 1 (2012) 147–168. doi:10.1166/jcsb.2012.1020.
- [182] V.L. C. Peetla, A. Stine, Biophysical interactions with model lipid membranes: applications in drug discovery and drug delivery, *Mol Pharm.* 6 (2009) 1264–1276. doi:10.1021/mp9000662.Biophysical.
- [183] N.S. Raja, K. Sankaranarayanan, A. Dhathathreyan, B.U. Nair, Interaction of chromium(III) complexes with model lipid bilayers: Implications on cellular uptake, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1808 (2011) 332–340. doi:10.1016/j.bbamem.2010.09.015.
- [184] C.T. Dillon, P.A. Lay, A.M. Bonin, M. Cholewa, G.J.F. Legge, Permeability, cytotoxicity, and genotoxicity of Cr (III) complexes and some Cr (V) analogues in V79 Chinese hamster lung cells, *Chem. Res. Toxicol.* 13 (1998) 742–748. doi:10.1021/tx0000116.
- [185] R. Saha, R. Nandi, B. Saha, Sources and toxicity of hexavalent chromium, *J. Coord. Chem.* 64 (2011) 1782–1806. doi:10.1080/00958972.2011.583646.
- [186] D. Long, L. Zou, M.Z. Hashmi, K. Cai, X. Tang, G. Chen, J. Shi, Determination of the accumulation, spatial distribution and reduction of Cr in unsaturated *Pseudochrobactrum saccharolyticum* LY10 biofilms by X-ray fluorescence and absorption methods, *Chem. Eng. J.* 280 (2015) 763–770. doi:10.1016/j.cej.2015.06.013.
- [187] Z. Pietralik, W. Kida, W. Andrzejewska, Structure and Conformational Dynamics of DMPC / Dicationic Surfactant and DMPC / Dicationic Surfactant / DNA Systems, 14 (2013) 7642–7659. doi:10.3390/ijms14047642.
- [188] R.S. Kalkur, A.C. Ballast, A.R. Triplett, Effects of deuterium oxide on cell growth and

vesicle speed in RBL-2H3 cells, *PeerJ*. (2014) 1–13. doi:10.7717/peerj.553.

- [189] A. Benda, L. Beranova, L. Cwiklik, P. Jurkiewicz, G. Gro, Effect of heavy water on phospholipid membranes: experimental confirmation of molecular dynamics simulations w, (2012) 14516–14522. doi:10.1039/c2cp41275f.
- [190] A. Jutila, P.K.J. Kinnunen, Novel features of the main transition of dimyristoylphosphocholine bilayers revealed by fluorescence spectroscopy, *J. Phys. Chem. B*. 101 (1997) 7635–7640. doi:10.1021/jp971400k.
- [191] P. Meleard, C. Gerbeaud, T. Pott, L. Fernandez-Puente, I. Bivas, M.D. Mitov, J. Dufourcq, P. Bothorel, Bending elasticities of model membranes: Influence of temperature and sterol content, *Biophys. J.* 72 (1997) 2616–2629. doi:10.1016/S0006-3495(97)78905-7.
- [192] R. Koynova, M. Caffrey, Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines, *Biochim. Biophys. Acta*. 1376 (1998) 91–145. doi:10.1016/S0304-4157(98)00006-9.
- [193] S. Tristram-Nagle, T. Moore, H.I. Petrache, J.F. Nagle, DMSO produces a new subgel phase in DPPC: DSC and X-ray diffraction study, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1369 (1998) 19–33. doi:10.1016/S0005-2736(97)00197-1.
- [194] I. Tsuyumoto, Y. Maruyama, X-ray fluorescence analysis of hexavalent chromium using K β satellite peak observed as counterpart of X-ray absorption near-edge structure pre-edge peak., *Anal. Chem.* 83 (2011) 7566–7569. doi:10.1021/ac201606c.
- [195] T. Yamamoto, Assignment of pre-edge peaks in K-edge x-ray absorption spectra of 3d transition metal compounds: electric dipole or quadrupole?, *X-Ray Spectrom.* 37 (2008) 572–584. doi:10.1002/xrs.
- [196] C.A. Schneider, W.S. Rasband, K.W. Eliceiri, NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis, *Nat. Methods*. 9 (2012) 671–675. doi:10.1038/nmeth.2089.
- [197] F. Henkler, J. Brinkmann, A. Luch, The role of oxidative stress in carcinogenesis induced by metals and xenobiotics, *Cancers (Basel)*. 2 (2010) 376–396. doi:10.3390/cancers2020376.
- [198] S. Paula, A.G. Volkov, A.N. Van Hoek, T.H. Haines, D.W. Deamer, Permeation of protons, potassium ions, and small polar molecules through phospholipid bilayers as a function of membrane thickness, *Biophys. J.* 70 (1996) 339–348. doi:10.1016/S0006-3495(96)79575-9.
- [199] A.A. Gurtovenko, I. Vattulainen, Pore Formation Coupled to Ion Transport through Lipid Membranes as Induced by Transmembrane Ionic Charge Imbalance : Atomistic Molecular Dynamics Study Pore Formation Coupled to Ion Transport through Lipid

- Membranes as Induced by Transmembrane Ionic Charge, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 17570–17571. doi:10.1021/ja053129n.
- [200] F. Bordi, C. Cametti, A. Naglieri, Ionic transport in lipid bilayer membranes, *Biophys. J.* 74 (1998) 1358–1370. doi:10.1016/S0006-3495(98)77848-8.
- [201] N.G. Howlett, S. V Avery, Induction of lipid peroxidation during heavy metal stress in *Saccharomyces cerevisiae* and influence of plasma membrane fatty acid unsaturation., *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997) 2971–6. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=168595&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [202] P.F. Fahey, W.W. Webb, Lateral Diffusion in Phospholipid Bilayer Membranes and Multilamellar Liquid Crystals, *Biochemistry.* 17 (1978) 3046–3053. doi:10.1021/bi00608a016.
- [203] F.X. Contreras, L. Sánchez-Magraner, A. Alonso, F.M. Goñi, Transbilayer (flip-flop) lipid motion and lipid scrambling in membranes, *FEBS Lett.* 584 (2010) 1779–1786. doi:10.1016/j.febslet.2009.12.049.
- [204] P. Vanýsek, Electrochemical series, in: J. Rumble (Ed.), *CRC Handb. Chem. Phys.* 98th Ed., CRC Press, 2017: pp. 8–29.
- [205] J.L. Campbell, T. Papp, Widths of the Atomic K–N7 Levels, *At. Data Nucl. Data Tables.* 77 (2001) 1–56. doi:10.1006/adnd.2000.0848.
- [206] F.D. Vila, T. Jach, W.T. Elam, J.J. Rehr, J.D. Denlinger, X-ray emission spectroscopy of nitrogen-rich compounds, *J. Phys. Chem. A.* 115 (2011) 3243–3250. doi:10.1021/jp108539v.
- [207] E. Gallo, C. Lamberti, P. Glatzel, Investigation of the valence electronic states of Ti(IV) in Ti silicalite-1 coupling X-ray emission spectroscopy and density functional calculations, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13 (2011) 19409–19419. doi:10.1039/c1cp21556f.
- [208] M. Rovezzi, P. Glatzel, Hard x-ray emission spectroscopy: A powerful tool for the characterization of magnetic semiconductors, *Semicond. Sci. Technol.* 29 (2014). doi:10.1088/0268-1242/29/2/023002.
- [209] N. Lee, T. Petrenko, U. Bergmann, F. Neese, S. Debeer, Supporting Information: Probing valence orbital composition with iron K-beta x-ray emission spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 9715–9727. doi:10.1021/ja101281e.
- [210] C.J. Pollock, K.M. Lancaster, K.D. Finkelstein, S. Debeer, Study of iron dimers reveals angular dependence of valence-to-core X-ray emission spectra, *Inorg. Chem.* 53 (2014)

10378–10385. doi:10.1021/ic501462y.

- [211] M.A. Beckwith, M. Roemelt, M.-N. Collomb, C. DuBoc, T.-C. Weng, U. Bergmann, P. Glatzel, F. Neese, S. DeBeer, Manganese K α X-ray Emission Spectroscopy As a Probe of Meta-Ligand Interactions, *Inorg. Chem.* 50 (2011) 8397–8409. doi:10.1021/ic200970t.
- [212] M.C. Biesinger, C. Brown, J.R. Mycroft, R.D. Davidson, N.S. McIntyre, X-ray photoelectron spectroscopy studies of chromium compounds, *Surf. Interface Anal.* 36 (2004) 1550–1563. doi:10.1002/sia.1983.
- [213] W.S. Epling, Potassium Dichromate by XPS, *Surf. Sci. Spectra.* 4 (1996) 168. doi:10.1116/1.1247821.
- [214] A. Jain, S.P. Ong, G. Hautier, W. Chen, W.D. Richards, S. Dacek, S. Cholia, D. Gunter, D. Skinner, G. Ceder, K.A. Persson, Commentary: The materials project: A materials genome approach to accelerating materials innovation, *APL Mater.* 1 (2013). doi:10.1063/1.4812323.