



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII

Zakład Biofizyki

Prof. dr hab. Tadeusz Sarna

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Bartosza Michałowskiego, zatytułowanej „Mechanistyczne aspekty detekcji reaktywnych form tlenu i azotu z wykorzystaniem wybranych próbników fluorescencjogennych”, wykonanej w Międzyresortowym Instytucie Techniki Radiacyjnej Politechniki Łódzkiej

Od przynajmniej 40 lat bada się mechanizmy i konsekwencje biologiczne generowania w układach biologicznych stresu oksydacyjnego, czyli zaburzenia równowagi pomiędzy procesami proutleniającymi i przeciwutleniającymi na korzyść tych pierwszych. Stresowi oksydacyjnemu, indukowanemu różnymi czynnikami fizykochemicznymi oraz biochemicznymi, przypisuje się udział w powstawaniu wielu chorób cywilizacyjnych, takich jak rak, miażdżyca, nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, choroba Parkinsona i Alzheimerera oraz inne schorzenia neurodegeneracyjne. Ze zrozumiałych więc względów czynione są wysiłki aby stres oksydacyjny monitorować na możliwie wczesnych etapach jego powstawania. W zasadzie powinno to być możliwe poprzez detekcję tzw. reaktywnych form tlenu lub jak proponują niektórzy częściowo zredukowanych form tlenu, zaangażowanych w stresie oksydacyjnym. Nie wiadomo jakie, dokładnie, reaktywne formy tlenu i azotu odpowiedzialne są na generowanie stresu oksydacyjnego w wielu układach biologicznych, jednak sporo uwagi poświęca się roli anionorodnika ponadtlenkowego i tlenku azotu. Chociaż obydwa rodniki nie są zbyt reaktywne, mogą brać udział w generowaniu wtórnych, znacznie bardziej reaktywnych form tlenu. Nie bez znaczenia jest również i to, że generowanie anionorodnika ponadtlenkowego i tlenku azotu towarzyszy tak kluczowym procesom biologicznym jak oksydacyjna fosforylacja, wybuch tlenowy podczas aktywacji komórek układu odpornościowego, czy sygnalizacja komórkowa. Od lat poszukuje się więc specyficznych i czułych metod detekcji anionorodnika ponadtlenkowego i tlenku azotu. Jednak ze względu na specyficzne parametry magnetyczne i spektroskopowe obydwu rodników, ich bezpośrednia detekcja w złożonych układach biologicznych, w warunkach zbliżonych do fizjologicznych, jest praktycznie niemożliwa. Z tego powodu w badaniach stresu oksydacyjnego stosuje się pośrednie metody detekcji reaktywnych form tlenu, wykorzystując różne sondy molekularne, których produkty oddziaływania z konkretnymi reaktywnymi formami tlenu mogą być stosunkowo łatwo oznaczone standardowymi metodami spektroskopowymi. Do najbardziej obiecujących należą próbki fluorescencjogenne, które w sprzyjających warunkach umożliwiają detekcję reaktywnych form tlenu w pojedynczej komórce. Pomimo wyjątkowej czułości i łatwości zastosowania w badaniach biomedycznych, metoda ta nie jest pozbawiona pewnych wad. Problemem jest nie tylko brak specyficzności detekcji konkretnych reaktywnych form tlenu ale również wpływ szeregu czynników komórkowych na aktywację próbników, utrudniający prawidłową interpretację uzyskanych wyników.

Tym właśnie zagadnieniom poświęcona jest praca doktorska mgr inż. Bartosza Michałowskiego zatytułowana „Mechanistyczne aspekty detekcji reaktywnych form tlenu i azotu z wykorzystaniem wybranych próbników fluorescencjogennych”. Praca ta została wykonana w Międzyresortowym

ul. Gronostajowa 7
30-387 Kraków
tel. +48 (12) 664 6504
email: tadeusz.sarna@uj.edu.pl

Instytucie Techniki Radiacyjnej Politechniki Łódzkiej, pod kierunkiem promotora – prof. dr hab. inż. Andrzeja Marcinka i promotora pomocniczego – dr inż. Adama Sikory.

Recenzowna rozprawa doktorska ma tradycyjny układ i składa się z kilku wyraźnie wydzielonych rozdziałów: krótkiego wstępu, dość obszernego i treściwego przeglądu literatury, wyników badań i dyskusji, dwustronicowego streszczenia i imponującego wykazu cytowanej literatury. Na końcu rozprawy znajduje się wykaz opublikowanych prac, których współautorem jest doktorant, oraz wykaz wystąpień mgr inż. Michałowskiego na międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych. Ponadto dołączony jest przedruk kluczowej pracy, której pierwszym autorem jest B. Michałowski, opisującej najważniejsze wyniki recenzowanej rozprawy doktorskiej. Na dorobek naukowy mgr inż. Bartosza Michałowskiego składa się 7 oryginalnych prac opublikowanych w międzynarodowych czasopismach naukowych o wysokim współczynniku oddziaływania i szerokiej cyrkulacji.

We wstępie do rozprawy, doktorant bardzo krótko odniósł się do przypisywanej fizjologicznej i patologicznej roli anionorodnika ponadtlenkowego i tlenku azotu, zwrócił uwagę na istotne problemy metodyczne związane z detekcją reaktywnych form tlenu i azotu i zasygnalizował omówienie w dalszej części rozprawy uzyskanych wyników, przede wszystkim dokładnej charakterystyki spektrofotometrycznej produktów jedno-elektronowego utlenienia wybranych próbników oraz wpływu niektórych czynników na wydajność detekcji anionorodnika ponadtlenkowego i tlenku azotu.

Przegląd literatury, obejmujący 51 stron pracy, składa się z dwu rozdziałów. W pierwszym, zatytułowanym „Reaktywne formy tlenu i azotu”, doktorant scharakteryzował podstawowe właściwości fizykochemiczne anionorodnika ponadtlenkowego, omówił główne źródła generowania tej reaktywnej formy tlenu w komórkach, zwracając szczególną uwagę na łańcuch transportu elektronów w mitochondriach, na oksydazę NADPH oraz oksydazę ksantynową. W dalszej części tego rozdziału doktorant opisał właściwości oksydacyjno-redukcyjne tlenku azotu, jego reaktywność chemiczną i aktywność biologiczną oraz mechanizmy generowania w układach biologicznych. W rozdziale tym znajduje się ponadto charakterystyka nadtlenoazotynu, produktu oddziaływania tlenku azotu z anionorodnikiem ponadtlenkowym oraz omówiono mechanizmy rozkładu tej reaktywnej formy tlenu. W drugim rozdziale zatytułowanym „Metody detekcji reaktywnych form tlenu i azotu”, doktorant dokonał krytycznego przeglądu dostępnych metod, ze szczególnym uwzględnieniem próbników spektroskopowych, a zwłaszcza próbników fluorescencyjnych. Na podkreślenie zasługuje wszechstronne omówienie hydroetydyny i jej pochodnych jako preferowanego próbniaka do detekcji anionorodnika ponadtlenkowego oraz próbników diaminowych do detekcji NO i innych reaktywnych form azotu. Ta część rozprawy doktorskiej wskazuje na świetne merytoryczne przygotowanie doktoranta i jego bardzo dobrą znajomość przedmiotu badań.

W kolejnym rozdziale zatytułowanym „Metodyka pracy”, mieszczącym się na 25 stronach rozprawy, doktorant zwięźle opisuje użyte materiały i zastosowanej w badaniach aparatury, podaje podstawy radiolizy impulsowej, oraz metody jednoelektronowego utleniania związków w roztworach wodnych przy użyciu rodników generowanych radiolitycznie. W rozdziale tym znajduje się również krótki opis pomiarów stacjonarnych przy użyciu techniki niskotemperaturowych szklów organicznych oraz dość szczegółowy opis zastosowanej w pracy ultrasprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną i spektroskopią mas. Rozdział kończy się zwięzłą informacją o przeprowadzonych obliczeniach kwantowo-mechanicznych i symulacji kinetyki reakcji rodników peroksylowych z hydroetydyną. Opis zastosowanych metod i materiałów w pełni odpowiada

standardom prac naukowych, w tym wymogowi aby przedstawiona informacja umożliwiła powtórzenie pomiarów w niezależnych badaniach.

Wyniki i ich dyskusja, opisane na 66 stronach, ilustrowane 54 rycinami i schematami oraz 7 tabelami, to najważniejsza część rozprawy doktorskiej B. Michałowskiego. Składa się z trzech rozdziałów, w których doktorant przedstawia szczegółową charakterystykę produktów jednoelektronowego utlenienia hydroetydyny i jej pochodnych, analizuje wpływ wybranych związków na detekcję anionorodnika ponadtlenkowego z wykorzystaniem hydroetydyny oraz omawia detekcję tlenu azotu z wykorzystaniem wybranych próbników diaminowych. Każdy z rozdziałów poprzedzony jest krótkim opisem celu i zakresu badań, a kończy się zwięzłym podsumowaniem uzyskanych wyników.

Tak więc celem badań opisanych w pierwszej części wyników była identyfikacja spektroskopowa kationorodnika hydroetydyny oraz produktów jednoelektronowego utlenienia metyloetydyny oraz N,N,N',N'-tertrametylohydroetydyny. Jest to o tyle istotne, że aktywacja hydroetydyny, prowadząca do wytworzenia jej kationorodnika, może determinować wydajność specyficznego produktu oddziaływania anionorodnika ponadtlenkowego z hydroetydyną – 2-OH-E⁺. Na podkreślenie zasługuje wysoka jakość widm absorpcji optycznej w zakresie światła widzialnego i bliskiej podczerwieni, jakie doktorant uzyskał w wyniku radiolizy hydroetydyny i jej dwu analogów w temperaturach kriogenicznych po zastosowaniu, jako rozpuszczalnika, odpowiednich cieczy jonowych z domieszką CH₂Cl₂. Potwierdzono, że kationorodnik hydroetydyny posiada dwa wyraźne pasma absorpcji zlokalizowane w obszarze 400-500 nm oraz 600-800 nm, które w różnym stopniu zależą od temperatury próbki. Podobne widma zarejestrowano również w przypadku benzydyny oraz wybranych analogów hydroetydyny. Widma te są praktycznie takie same jak widma różnicowe indywiduów otrzymanych po radiolizie impulsowej benzydyny i hydroetydyny w warunkach jednoelektronowego utlenienia tych związków. Ważnym wynikiem pracy doktorskiej mgr inż. B. Michalskiego są obliczenia kwantowo-mechaniczne przeprowadzone dla produktów jednoelektronowego utlenienia hydroetydyny, metyloetydyny i N,N,N',N'-tertrametyloetydyny. Warto podkreślić, że energie głównych przejść elektronowych analizowanych indywiduów, wyliczone metodą zależnego od czasu funkcyjonu gęstości (TD-DFT), pokrywają się, z dokładnością ~0.25 eV, ze zmierzonymi widmami absorpcji tych indywiduów. Innym godnym odnotowania wynikiem przeprowadzonych obliczeń było wyznaczenie rozkładu gęstości spinowej w badanych rodnikach. Okazało się, że wysoka gęstość spinowa (0,189) na atomie (C-2) w środkowym pierścieniu aromatycznym kationorodnika HE⁺ warunkuje regioselektywność reakcji z anionorodnikiem ponadtlenkowym prowadzącej do wytworzenia 2-OH-E⁺. W dalszej części tego rozdziału doktorant przeprowadził szczegółową analizę oddziaływania hydroetydyny z jednolektronowymi utleniaczami generowanymi radiolizą impulsową. Zarówno rodnik azydowy, jak i anionorodnik węglanowy i rodnik dwutlenku azotu oraz rodniki glutationylowe i cysteinylowe generują kationorodnik hydroetydyny. Dwumolekularne stałe szybkości tego oddziaływania mieszczą się w przedziale $2,9 \times 10^8 - 5,2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Do bardzo ciekawych i wartościowych należą wyniki pomiarów oddziaływania hydroetydyny z rodnikami peroksyłowymi różniącymi się jednoelektronowym potencjałem redukcji. Pomiar te umożliwiły doktorantowi oszacować stałą szybkości reakcji hydroetydyny z rodnikiem wodoronadtlenkowym, jako równą $8 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Stała ta jest porównywalna do wartości, którą wyznaczono na podstawie symulacji kinetycznych reaktywności rodników peroksylowych. Tą samą metodą doktorant wyznaczył stałą szybkości oddziaływania hydroetydyny z anionorodnikiem ponadtlenkowym, która okazała się aż o dwa rzędy niższa w porównaniu do wartości, którą wyznaczono wcześniej w niezależnych badaniach.

Celem badań których wyniki i ich dyskusja opisane są w następnym rozdziale rozprawy doktorskiej mgr inż. Michalskiego było sprawdzenie jak wybrane czynniki wpływają na wydajność powstawania kationu 2-hydroksyetydyny oraz na profil utleniania hydroetydyny. Takie badania są niezbędne dla określenia rzeczywistej skuteczności detekcji anionorodnika ponadtlenkowego przy pomocy hydroetydyny w układach biologicznych, w których czynniki mogą występować. Sprawdzono więc wpływ peroksydazy chrzanowej, która katalizowała jednoelektronowe utlenianie hydroetydyny, jonów żelaza w układzie ksantyna/oksydaza ksantynowa, napędzającym tzw. reakcję Fentona oraz glutationu, którego rodniki glutationylowe, suflinylowe i nadtelnkowe również zdolne są do utlenienia hydroetydyny. Do najważniejszych wyników tej części pracy doktorskiej należy wykazanie, że głównym produktem utleniania hydroetydyny przez anionorodnik ponadtlenkowy jest 2-OH-E⁺, natomiast w układzie, w którym ma miejsce efektywna dysmutacja anionorodnika powstają niespecyficzne produkty dysmutacji i dimeryzacji kationorodnika hydroetydyny. Ponadto zarówno jony żelaza jak i glutation w układzie, w którym generowany jest anionorodnik ponadtlenkowy, zwiększają wydajność powstawania 2-OH-E⁺.

Kolejny rozdział opisuje wyniki badań nad wykorzystaniem próbników diaminowych do detekcji tlenu azotu w złożonych układach doświadczalnych, w których jednocześnie generowano anionorodnik ponadtlenkowy lub do których dodawano azydek sodu, glutation albo wodorowęglan sodu. Doktorant stwierdził, że o ile szybkość N-nitrozowania próbника DAN przyjmuje największą wartość kiedy stosunek szybkości generowania tlenu azotu do anionorodnika ponadtlenkowego wynosi 3:1, to wydajność N-nitrozowania próbника RHPDA stopniowo maleje ze wzrostem strumienia anionorodnika ponadtlenkowego. Doktorant wykazał ponadto, że za N-nitrozowanie zastosowanych próbników odpowiadają dwa mechanizmy reakcji, przy czym ich udział jest inny w przypadku DAN oraz RHPDA.

Uzyskane przez doktoranta wyniki należy uznać za znaczące osiągnięcie badawcze; wyniki te mogą i powinny być wykorzystane przez badaczy, którzy stosują, niekiedy rutynowo, próbники fluorescencjonogenne do detekcji reaktywnych form tlenu i azotu. Jestem przekonany, że odpowiednia wiedza z tego zakresu przyczyniłaby się do uniknięcia błędnych interpretacji, jakie, niestety, można znaleźć w wielu opublikowanych już pracach.

Rozprawa doktorska mgr inż. B. Michałowskiego jest logicznie i przejrzysto zredagowana, a zamieszczone rysunki spełniają zamierzony cel. Praca napisana jest poprawną polszczyzną i nie zawiera błędów merytorycznych ani wątpliwych interpretacji wyników. Z obowiązku recenzenta muszę jednak zwrócić uwagę na drobne nieścisłości i błędy drukarskie, na jakie natknąłem się przy czytaniu rozprawy.

1. Wbrew temu, co sugeruje tekst na stronie 13, Leonor Michaelis nie był kobietą. Pomyłka ta może wynikać z tego, że tzw. równanie Michaelis-Menten opisuje jeden z najbardziej znanych modeli kinetyki reakcji enzymatycznej, przy czym Maud Leonora Menten rzeczywiście była kobietą.
2. Czy doktorant uważa, iż jednoelektronowa redukcja tlenu azotu prowadzi do powstania wzbudzonego stanu trypletowego anionu nitroksylowego (reakcja 2.19)?
3. str 38: zamiast „cztery próbники” powinno być „cztery próbni”
4. str 94: zamiast „krótkofalowe pasmo absorpcji znajduje się w zakresie 700-1000 nm” powinno być „długofalowe pasmo...”

5. Podpis osi na rysunku 5.4B : zamiast "stężenie HE" powinno być „stężenie Benz”
6. str 110: zamiast „(reakcja 5.4, Rysunek 5.20)” powinno być „(reakcja 5.5, Rysunek 5.18)”, oraz zamiast „(Rysunek 5.19A)”, powinno być: „(Rysunek 5.18)”.
7. str 111: zamiast „ $k_{5,4} = (8,0 \pm 0,3) \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ”, powinno być „ $k_{5,5} \dots$ ”
8. str 112: zamiast „ $k_{5,5} = 3500 \text{ M}^{-1}$ ” powinno być „ $K_{5,6} \dots$ ” oraz zamiast „ $k_{5,5} = 2,9 \times 0,1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ” powinno być „ $k_{5,7} = 2,9 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ”
9. str 115: zamiast „w reakcji 5.9” powinno być „w reakcji 5.10”
10. str 119: chociaż w tekście doktorant odwołuje się do Rysunku 5.31A, takiego rysunku nie ma w pracy.
11. str 149 – 150: w podpisach pod rysunkami 7.4, i 7.5 chyba błędnie podano stężenie DTPA, które miałyby wynosić aż 0,1 M!

Te, w sumie, drobne niedociągnięcia nie mają wpływu na ocenę rozprawy doktorskiej mgr inż. B. Michalskiego, którą uważam za bardzo dobrą i wartościową. Rozprawa spełnia zwyczajowe standardy prac doktorskich z chemii oraz wymogi art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym i dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej o dopuszczenie mgr inż. Bartosza Michałowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



/Tadeusz Sarna/

Kraków, 12 kwietnia 2017