

**Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Karoliny Dębowskiej, zatytułowanej  
„Charakterystyka wybranych antyoksydantów oraz próbników wykorzystywanych do  
detekcji nadtlenoazotynu”, wykonanej w Międzyresortowym Instytucie Techniki  
Radiacyjnej Politechniki Łódzkiej**

Wzrost zainteresowania biologiczną rolą nadtlenoazotynu datuje się od 1990 roku, kiedy to J. Beckman i współpracownicy w swojej pracy opublikowanej w PNAS, postulowali powstawanie in vivo tej reaktywnej formy tlenu i azotu. Generowanie nadtlenoazotynu w warunkach wzmożonej produkcji anionorodnika ponadtlenkowego i tlenku azotu, może tłumaczyć uszkodzenia układu biologicznego w wyniku tzw. stresu oksydacyjnego. Wydaje się, że silnie utleniający nadtlenoazotyn, produkt bardzo szybkiej rekombinacji rodników NO i O<sub>2</sub><sup>-</sup>, jest odpowiedzialny za utleniające modyfikacje białek towarzyszących stresowi oksydacyjnemu. Ma to sens, jeśli uświadomić sobie, że zarówno anionorodnik ponadtlenkowy jak i tlenek azotu, które generowane są przez procesy prowadzące do stresu oksydacyjnego, są słabymi utleniaczami i, jako takie, raczej nie oddziałują efektywnie z ważnymi składnikami komórek. Koncepcja o kluczowej roli nadtlenoazotynu w stresie oksydacyjnym, była rozważana przez różnych badaczy, jednak najbardziej przekonujący dowód doświadczalny o generowaniu nadtlenoazotynu zarówno in vitro jak i in vivo, uzyskał profesor T. Maliński z Ohio University, monitorując w czasie rzeczywistym generowanie i zanik anionorodnika ponadtlenkowego, tlenku azotu i nadtlenoazotynu przy pomocy specjalnych nanoelektrod. Chociaż elektrochemiczna metoda detekcji reaktywnych form tlenu i azotu, zastosowana przez grupę profesora Malińskiego, jest niezwykle elegancka i czuła, ze względu na skomplikowaną technikę i niezbędne przygotowanie merytoryczne, nie nadaje się do powszechnego zastosowania w większości laboratoriów o profilu medycznym i biologicznym. Z tego właśnie powodu, prowadzone są intensywne badania nad próbnikami molekularnymi, które poprzez selektywne oddziaływanie z reaktywnymi formami tlenu i azotu przekształcają się w produkty wykazujące łatwą do detekcji charakterystyczną fluorescencję. Niestety, jak dotychczas praktycznie nie ma próbników, które bez zastrzeżeń można stosować do detekcji reaktywnych form tlenu i azotu w żywych komórkach w przekonaniu, że otrzymane wyniki da się jednoznacznie zinterpretować. Wymagałoby to bowiem próbników wykazujących bardzo dużą selektywność i odpowiednio wysoką efektywność oddziaływania z konkretnymi RFA lub RFT. Ponadto, oddziaływanie to nie powinno być w sposób istotny modyfikowane przez donory elektronu, które występują w wysokich stężeniach w żywych komórkach.

Tą ważną i aktualną tematyką zajmowała się mgr inż. Karolina Dębowska, a efektem jej badań są wyniki opisane i przedyskutowane w rozprawie doktorskiej zatytułowanej „Charakterystyka wybranych antyoksydantów oraz próbników wykorzystywanych do detekcji nadtlenoazotynu”. Należy podkreślić, że najważniejsze wyniki tych badań zostały opublikowane w dwu pracach, które ukazały się drukiem w 2015 i 2016 roku w bardzo dobrych specjalistycznych czasopiśmie naukowych – *Chemical Research in Toxicology* oraz *Pharmacological Reports*. W pracach tych mgr inż. K. Dębowska jest pierwszym współautorem. Doktorantka jest ponadto współautorem dwu innych prac doświadczalnych, które dotyczą badań na próbnikami

fluorescencjogennymi do detekcji nitroksyli oraz mechanizmu oksydatywnej konwersji Amplex Red do rezorufinu. Prace te opublikowane zostały w czołowym czasopiśmie specjalistycznym *Free Radical Biology and Medicine*.

Praca doktorska mgr inż. Karoliny Dębowskiej została wykonana w Międzyresortowym Instytucie Techniki Radiacyjnej, Politechniki Łódzkiej, wiodącej jednostce naukowo-badawczej w Polsce, w której syntetyzowane i charakteryzowane są nowe sondy molekularnych do oznaczania reaktywnych form tlenu i azotu. Promotorem pracy doktorskiej był prof. dr hab. inż. Andrzej Marcinek a promotorem pomocniczym dr inż. Adam Sikora.

Praca doktorska mgr inż. K. Dębowskiej została zredagowana w dość typowy sposób dla tego rodzaju opracowań. Po spisie treści i wykazie używanych skrótów znajduje się bardzo zwarte „Wprowadzenie”, w którym doktorantka charakteryzuje przedmiot swoich badań podkreślając rolę odpowiednio czułych i rzetelnych metod detekcji nadtelnoazotynu oraz efektywność salenowych kompleksów manganu w neutralizacji nadtelnoazotynu, anionorodnika ponadtlennowego oraz nadtlenu wodoru. „Przegląd literaturowy” zajmuje 37 stron pracy i zawiera najważniejsze informacje o fizykochemicznych właściwościach nadtelnoazotynu, anionorodniku ponadtlennowym, tlenku azotu i o procesach, w których generowane są te reaktywne formy tlenu i azotu zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo*. Bardzo ciekawą i informatywną częścią tego rozdziału jest opis oddziaływania nadtelnoazotynu z dwutlenkiem węgla, grupami karbonyłowymi, metalami grup prostetycznych ważnych metaloprotein, aminokwasami i białkami oraz niskocząsteczkowymi przeciwutleniaczami, zwłaszcza z glutationem. Ze zrozumiałych względów detekcja nadtelnoazotynu przy pomocy próbników luminescencyjnych, zwłaszcza próbników boronowych, zajmuje specjalne miejsce w przedstawionym przez doktorantkę omówieniu. „Przegląd literaturowy” i „Bibliografia”, zawierająca 224 najbardziej istotnych odnośników do fachowej literatury, potwierdzają, że mgr inż. Karolina Dębowska bardzo dobrze orientuje się w tematyce badań, które stanowią przedmiot jej pracy doktorskiej, w pełni zdając sobie sprawę nie tylko z zalet próbników używanych w wielu laboratoriach świata do detekcji stresu oksydacyjnego, ale również z ograniczeń ich stosowalności.

Opis i dyskusja otrzymanych przez doktorantkę wyników poprzedzone są ponad pięciostronicowym rozdziałem „Metodyka pracy”, w której znajduje się zwarte ale treściwy opis pomiarów spektrofotometrycznych i spektrofluorometrycznych oraz opracowania uzyskanych danych, pomiarów szybkości generowania anionorodnika ponadtlennowego w układzie ksantyna/oksydaza ksantynowa oraz szybkości uwalniania tlenku azotu z zastosowanego donora. W rozdziale tym znajduje się ponadto krótki opis stosowanych odczynników i roztworów oraz odniesienie do opublikowanej wcześniej metodyki syntezy próbników boronowych i salenowych kompleksów manganowych. Rozdział kończy się krótką informacją o metodyce badań komórkowych, który zostały wykonane we współpracy z zespołem prof. dr hab. n. med. Stefana Chłopickiego,

„Wyniki badań i dyskusja” to najobszerniejsza część rozprawy doktorskiej mgr inż. K. Dębowskiej, która mieści się na 58 stronach. Składa się z dwu oddzielnych rozdziałów zatytułowanych: „Charakterystyka nowosyntetyzowanych próbników boronowych” oraz „Katalityczna aktywność salenowych kompleksów manganu”. Na początku rozdziałów podane są cele i zakres badań, a rozdział opisujący wyniki badań nad salenowymi kompleksami

manganu zawiera dodatkowo ponad trzy-stronicowe „Wprowadzenie”. Nie jestem przekonany czy wybrana przez doktorantkę organizacja tej części rozprawy jest najbardziej zasadna. Muszę przyznać, że jestem przyzwyczajony do bardziej tradycyjnego sposobu przedstawiania w pracach doktorskich celu badań oraz ich wyników i dyskusji. Jest to jednak moja subiektywna preferencja, która nie wpływa na ocenę rozprawy doktorskiej.

Celem pierwszej części badań mgr inż. K. Dębowskiej była charakterystyka spektroskopowa dwu nowych próbników boronowych – pochodnych fluoresceiny oraz zbadanie ich reaktywności z nadtlendioazotynem i innymi wybranymi reaktywnymi formami tlenu i azotu. Ważną częścią tych badań było również ustalenie czy próbki te nadają się do detekcji RFT i RFA w obecności glutationu, który występuje w znacznym stężeniu w komórkach.

Przed omówieniem wyników doktorantka krótko opisuje syntezę estru (4-(pinakoloborono)-benzylo)fluoresceiny (FBBE) oraz 4-(pinakoloborono)benylowej pochodnej 7-hydroksykumaryny (CBBE), które były wykorzystane w przeprowadzonych badaniach.

Analizując zmiany absorpcji optycznej FBBE i CBBE w zależności od stężenia nadtlendioazotynu, doktorantka wnioskuje o stechiometrycznym oddziaływaniu próbników z tym utleniaczem. Pomiar widm fluorescencyjnych próbników w zależności od stężenia nadtlendioazotynu umożliwiły identyfikację pasm emisji przydatnych dla detekcji utleniacza oraz stwierdzenie, iż oksydacyjna konwersja próbników do produktów silnie fluoryzujących jest reakcją dwuetapową.

Stosując metodę reakcji konkurencyjnych, przy zastosowaniu związku o znanej stałej szybkości oddziaływania z konkretnym utleniaczem, doktorantka zmierzyła reaktywność FBBE z nadtlendioazotynem, kwasem cholerym (I) i nadtlendioazotynem. Chociaż CBBE, w porównaniu do FBBE, reaguje przynajmniej dwukrotnie szybciej z nadtlendioazotynem, dość silna fluorescencja tego próbniaka, nawet pod nieobecność utleniacza, preferuje FBBE do detekcji nadtlendioazotynu. Doktorantka wykazała ponadto, iż z innym silnym utleniaczem – kwasem chlorowym (I) FBBE reaguje kilkadziesiąt razy wolniej niż z nadtlendioazotynem, natomiast z nadtlendioazotynem ponad pięć rzędów wielkości wolniej. Bardzo ciekawe i ważne dla zastosowań biologicznych są wyniki analizy wpływu glutationu na utlenianie FBBE indukowane nadtlendioazotynem, nadtlendioazotynem lub kwasem chlorowym (I), a także układach, gdzie generowany jest tlenek azotu lub anionorodnik ponadtlendioazotynowy. Okazało się, że glutation, który stanowi silny zmiatacz HOCl, praktycznie uniemożliwia jego detekcję przy pomocy FBBE, nawet przy stosunkowo małych stężeniach reduktora. Ponadto, milimolowe stężenia GSH znacząco obniżają poziom konwersji FBBE do produktu fluoryzującego indukowanej nadtlendioazotynem. Praktycznie pomijalny wpływ glutationu na utlenianie FBBE przez nadtlendioazotyn sugeruje, iż detekcja tego utleniacza przy pomocy FBBE powinna być możliwa również w komórkach. Postulat ten został potwierdzony doświadczalnie na komórkach linii EAhy.926, w których stres oksydacyjny indukowano doksorubicyną, znanym lekiem przeciwnowotworowym o silnych właściwościach protleniających. Wyniki tych badań sugerują, że za toksyczne działanie doksorubicyny odpowiada nadtlendioazotyn.

W rozdziale, w którym doktorantka charakteryzuje utlenianie próbników boronowych, przedstawione są ponadto wyniki pomiarów wybranych analogów kumaryny jako potencjalnych sond fluorescencyjnych do pomiaru wewnątrzkomórkowego pH. Analizowano 4 takie związki, z których dwa zawierały dodatnio naładowane grupy fosfoniowe, a pozostałe dwa grupy

trietiloaminową lub grupę cyklamu. pKa wszystkich tych związków mieści się pomiędzy 7,35 i 7,79, dlatego przy zmianie pH w przedziale 5 – 9 obserwuje się wyraźną zmianę ich widm wzbudzenia fluorescencji. Chociaż istnieje duże zapotrzebowanie na wewnątrzkomórkowe sondy molekularne monitorujące pH w różnych stanach funkcjonalnych komórek, dość niska wydajność fluorescencji badanych analogów kumaryn oraz wzbudzanie tych związków potencjalnie toksycznym promieniowaniem ultrafioletowym, zmniejsza szansę na ich powszechne stosowanie w badaniach biomedycznych. Muszę ponadto zauważyć, że badania analogów kumaryny jako sond fluorescencyjnych do pomiaru pH, nie są w oczywisty sposób związane z przedstawionym celem pracy, pomimo, iż uzyskane wyniki są ciekawe i zasługują na uwagę.

Celem drugiej części badań, opisanych w rozprawie doktorskiej K. Dębowskiej, było określenie zdolności wybranych salenowych kompleksów manganu do katalitycznego usuwania nadtlenuazotynu i wyznaczenie kinetycznych parametrów tej reakcji. Z uwagi na możliwość terapeutycznego zastosowania salenowych kompleksów manganu, dodatkowym celem badań była ocena potencjalnie toksycznego działania tych związków poprzez pomiar zdolności do zwiększania wydajności nitrowania tyrozyny oraz określenia ich proutleniającego działania.

Mgr inż. K. Dębowska analizowała 5 salenowych kompleksów manganu, różniących się obecnością podstawników metoksy- w pozycji orto- pierścieni fenylowych oraz dodatkowym pierścieniem aromatycznym w miejscu mostka etylenodiaminowego. Stosując technikę zatrzymanego przepływu doktorantka analizowała zanik pasma absorpcji nadtlenuazotynu po zmieszaniu z roztworem salenowego kompleksu manganu. Zakładając proponowany przez Sharpe'a i współ. mechanizm katalitycznego działania kompleksów salenowych, którego pierwszym etapem jest utworzenie okso-kompleksu manganu a drugim odtworzenie macierzystego kompleksu poprzez oddziaływanie z kolejną cząsteczką nadtlenuazotynu, katalityczną stałą szybkości reakcji neutralizacji tego utleniacza, wyliczono z analizy kinetycznej przeprowadzonych pomiarów. Wyznaczone przez doktorantkę stałe szybkości reakcji nadtlenuazotynu z badanymi kompleksami pokazują, że najbardziej aktywnym katalizatorem rozkładu nadtlenuazotynu ( $k = 12000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) jest EUK-161, czyli kompleks zawierający pierścień pirydyny, natomiast najmniejszą aktywność ( $k = 2100 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) wykazuje związek prototypowy EUK-108. Oznacza to, że stosunkowo proste modyfikacje strukturalne salenu skutkują wzrostem katalitycznej aktywności kompleksów salenowych manganu. Z analizy parametrów kinetycznych reakcji kompleksów z nadtlenuazotynem wynika, iż pierwszy etap tych reakcji jest stukrotnie szybszy niż etap drugi. Tak więc reakcja okso-kompleksu z nadtlenuazotynem determinuje wypadkową szybkość katalitycznego rozkładu tego utleniacza przy udziale salenowych kompleksów manganu.

Stosując metodę reakcji konkurencyjnych, w których nadtlenek wodoru ulegał reakcji z kwasem 4-nitrofenyloboronowym lub katalitycznemu rozkładowi przez salenowe kompleksy manganowe, doktorantka wyznaczyła stałe szybkości tego drugiego procesu. Okazało się, że jako mimetyki katalazy, salenowe kompleksy manganu charakteryzują się stosunkowo niską efektywnością rozkładu nadtlenu wodoru, przy czym najbardziej aktywnym jest EUK-161, którego katalityczna stała jest sześciokrotnie wyższa od EUK-108. Z drugiej strony, badane przez doktorantkę związki są atrakcyjnymi mimetykami dysmutazy ponadtlenkowej, ponieważ wyznaczone katalityczne stałe szybkości dysmutacji anionorodnika panadtlenkowego wynoszą (1.4 –

$3,7) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Jest to milion razy szybciej niż katalizowany nimi rozkład nadtlenu wodoru i sto - tysiąca razy szybciej niż rozkład nadtlenu azotu. Warto odnotować, że wyznaczone w recenzowanej pracy doktorskiej stałe katalityczne są o dwa rzędy wielkości większe niż dane literaturowe opisujące właściwości EUK-108 oraz EUK-113. Doktorantka zwraca uwagę na względnie dobrą korelację pomiędzy wartościami katalitycznych stałych szybkości rozkładu nadtlenu azotu i nadtlenu wodoru, co może sugerować podobny mechanizm reakcji salenowych kompleksów manganu z tymi reaktywnymi formami azotu i tlenu.

Proutleniające właściwości salenowych kompleksów manganu były badane poprzez analizę ich wpływu na nitrowanie tyrozyny przez nadtlenu azotyn. Doktorantka wykazała, że wszystkie badane kompleksy w mniejszym lub większym stopniu zwiększają stopień nitrowania tyrozyny, co można tłumaczyć jednoelektronowym utlenianiem tego aminokwasu przez okso-kompleksy. Stwierdzono ponadto, że wszystkie salenowe kompleksy manganu wykazują aktywność peroksydacyjną, za którą prawdopodobnie odpowiedzialne są rodniki OH i NO<sub>2</sub>, powstające z rozkładu nadtlenu azotynu.

Pracę kończy jedno-stronicowe streszczenie, w którym doktorantka podsumowała najważniejsze wyniki przeprowadzonych badań.

Rozprawa doktorska mgr inż. Karoliny Dębowskiej napisana została poprawną polszczyzną i nie zawiera wyraźnych błędów drukarskich, z wyjątkiem kilku drobniaków, które przy okazji wskażę doktorantce. Nie znalazłem błędów merytorycznych ani wątpliwych interpretacji omawianych wyników. Zamieszczone schematy reakcji oraz rysunki i tabele ilustrujące spełniają swój cel, bo ułatwiają ocenę znaczenia uzyskanych wyników i lepsze zrozumienie przeprowadzonej dyskusji.

Wyniki uzyskane przez doktorantkę należy uznać za wartościowe i ważne dla szerokiego kręgu badaczy, którzy niemal rutynowo używają próbników fluorescencjogennych do detekcji stresu oksydacyjnego w układach biologicznych i identyfikacji reaktywnych form tlenu i azotu. Można mieć nadzieję, że dokładna charakterystyka boronowych próbników nadtlenu azotynu, którą przedstawiła doktorantka, powinna przyczynić się do uniknięcia błędów w interpretacji wyników, jakie zbyt często pojawiają się w pracach publikowanych nawet w najlepszych czasopismach naukowych.

Rozprawa doktorska mgr inż. Karoliny Dębowskiej 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. Karoliny Dębowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



/Tadeusz Sarna/

Kraków, 31 marca 2019