



UNIWERSYTET
WARSZAWSKI

Wydział Chemii



Warszawa, 20.12.2021

dr hab. Agnieszka Więckowska, prof. UW
Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski
Pracownia Teorii i Zastosowań Elektrod

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Iwony Magdaleny Ufnalskiej
z tytułem:

„Badanie procesu redukcji jonów Cu(II) związanych z tripeptydem GHK z udziałem glutationu”

Rozprawa doktorska mgr inż. Iwony Ufnalskiej, zatytułowana: „Badanie procesu redukcji jonów Cu(II) związanych z tripeptydem GHK z udziałem glutationu” wykonana została na Wydziale Chemii Politechniki Warszawskiej, pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Wojciecha Wróblewskiego i dr Urszuli Wawrzyniak, jako promotora pomocniczego.

Praca doktorska, w szerszym rozumieniu, dotyczy próby wyjaśnienia zjawiska redukcji jonów miedzi (II) w środowisku pozakomórkowym w celu przetransportowania jonów tego pierwiastka do wnętrza komórki za pomocą błonowych transporterów jednowartościowych jonów metali czyli białek z rodziny CTR (Copper transporter family). Jedną z koncepcji wskazuje, że to reduktory takie jak glutation, obecne w organizmach żywych, mogą być odpowiedzialne za proces redukcji jonów miedzi (II) do miedzi (I). Celem bezpośrednim rozprawy było wyjaśnienie mechanizmu oddziaływania jonów miedzi skompleksowanych peptydem GHK z glutationem jako jednej z możliwych dróg dostarczania jonów miedzi (I) do kanału CRT1.

Tematyka pracy doktorskiej jest aktualna i ważna, ponieważ dotyczy fundamentalnych zjawisk funkcjonowania organizmów żywych z zachowaniem kruchej homeostazy w zanieczyszczonym środowisku. Mimo znacznego postępu w każdej z dziedzin nauki, istnieje szereg zjawisk, które nie zostały jednoznacznie wyjaśnione i do takich właśnie zalicza się sposób dostarczania do komórek niezbędnego dla prawidłowego funkcjonowania pierwiastka - miedzi. Jednym z najpowszechniej występujących w przyrodzie ożywiających reduktorów jest glutation, czyli tripeptyd pełniący w organizmach wiele różnych ról, począwszy od ochrony przed reaktywnymi formami tlenu, poprzez udział w procesach fałdowania białek oraz ich biodegradacji jako czynnik kontrolujący aktywność proteosomu. Dlatego, koncepcja wykorzystania właściwości redukujących glutationu do generowania formy miedzi, która może być przenoszona przez błonę komórkową do wnętrza komórki wydaje się wielce prawdopodobna. Jednak wyjaśnienie mechanizmu oddziaływania skompleksowanych jonów miedzi (II) z glutationem jest zadaniem bardzo ambitnym i wymagało od Doktorantki dużego zaangażowania w prace badawcze pod względem koncepcyjnym jak i metodologicznym.

Przedstawiona do recenzji praca liczy 166 stron i ma standardowy układ obejmujący: streszczenie w języku polskimi oraz angielskim, przegląd literaturowy, osobno zdefiniowany cel pracy, wyniki badań własnych, wraz z metodyką pomiarów, podsumowanie i wnioski, spis prac własnych oraz cytowanej literatury. Dodatkowo, zamieszczono spis skrótów i oznaczeń, co ułatwia rozumienie tekstu oraz załącznik zawierający wyniki pomiarów wykonanych przez współpracowników.

We wstępnej części rozprawy mgr Iwona Ufnalska omawia zagadnienia chemii koordynacyjnej, przy czym rozdział ten jest nieco szkolny, ze zbędnym, w moim odczuciu, rysunkiem 1. Następnie, szczegółowo przedstawione są zagadnienia dotyczące jonów miedzi, aktywności biologicznej, szlaków transportowych przez błonę komórkową czy sposobu koordynacji przez różne ligandy. W kolejnych rozdziałach wprowadzenia literaturowego Autorka przybliżyła sposób wiązania jonów miedzi (II) przez oligopeptydy. W tym miejscu, ponownie, wydaje mi się, że praca nie straciłaby na czytelności, gdyby rysunek 4 zastąpić tylko wzorami aminokwasów budujących peptydy będące przedmiotem zainteresowania. W rozdziale tym scharakteryzowano zarówno sposób koordynacji jonów miedzi (II) przez oligopeptydy, zawierające łańcuchy proste, a także przedstawiono sposób tworzenia struktur przestrzennych jonów miedzi (II) z peptydami zawierającymi histydynę w pozycji 1, 2 bądź 3 względem N-końca. Następnie opisano kompleksy ternarne, czyli trójskładnikowe, zawierające jon miedzi(II), ligand w postaci jednego lub dwóch oligopeptydów i ewentualnie dodatkowy ligand nieorganiczny. Koniec rozdziału, z punktu widzenia tematu pracy jest najciekawszy, ponieważ jest skupiony na badanych oligopeptydach. Autorka tłumaczy znaczenie biologiczne peptydu GHK, sposób tworzenia struktury 3N podczas koordynacji jonu Cu(II) i tworzenia struktur ternarnych w obecności ligandów takich jak: histydyna, imidazol, czy sam GHK. Następnie, opisuje strukturę glutationu, jego biologiczne funkcje i sposoby regulacji jego stężenia w organizmie. Oddziaływania glutationu z jonami miedzi i kompleksami miedzi są przedmiotem kolejnych podrozdziałów.

Ogólną uwagą krytyczną do opisu w części teoretycznej to mnogość wtrąceń w nawiasach, co wydatnie rozprasza czytającego. Oczywiście istotne informacje warto są wpleceni w tekst, lecz jeśli są tylko ciekawostką, tzw. informacją „dla kultury osobistej”, to myślę że ich stężenie jest nieco zbyt duże w pracy by czytało się ją płynnie. Jednym z zabawniejszych wtrąceń w nawiasach, była informacja w których drogeriach można kupić preparaty zawierające kompleksy z GHK.

Kolejnym, drobnym potknięciem jest brak konsekwencji w stosowaniu skrótów. Czasem autorka odnosi się do nazw polskich - RFT jako reaktywne formy tlenu a nie ROS (Reactive Oxygen Species) a czasem do nazw angielskich, pomimo, że w języku polskim taki skrót istnieje, np. przewlekła obturacyjna choroba płuc (POChP), przy czym Autorka podaje skrót COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease). Błędem jest również używanie apostrofu podczas odmiany nazwisk kończących się na spółgłoskę, co zdarzyło się w przypadku choroby „Alzheimer’a” na stronie 57, podczas gdy na stronie 27, 37,48 odmienione nazwisko zostało zapisane poprawnie. Są to oczywiście drobne pomyłki, które zdarzają się nam wszystkim a ja wspominam o nich tylko z obowiązku recenzenta.

W tym miejscu chciałabym podkreślić, że mgr inż. Iwona Ufnalska bardzo wyczerpująco przedstawiła najistotniejsze zagadnienia niezbędne do zrozumienia motywacji i sformułowania celów rozprawy. Dokonała wyboru aktualnej, obejmującej 209 pozycji literatury, skąd przytoczyła różne koncepcje i odniosła się do nich. Cel pracy, zaprezentowany po wprowadzeniu literaturowym, jest jasny i zrozumiały dla czytelnika.

W rozdziałach 6 i 7 mgr inż. Ufnalska podaje metodykę prowadzonych eksperymentów: używane odczynniki, materiały, aparaturę, opisuje również stosowane przez siebie oraz współpracowników techniki badawcze. W opisie woltamperometrii cyklicznej na stronie 70 pojawiło się niefortunne sformułowanie „Rejestrowane sygnały są bardziej smukłe...”, co myślę, mogłoby być zastąpione informacją o szerokości połówkowej sygnału w przypadku procesu adsorpcyjnego i dyfuzyjnego. Natomiast moja uwaga praktyczna, będąca jedynie wskazówką jest taka, by nie stosować ultradźwięków podczas czyszczenia elektrod dyskowych, gdyż takie działanie często prowadzi do rozszczelnienia pomiędzy materiałem elektrody a obudową, wżerów, zmiany powierzchni elektrody, a nawet zmiany mechanizmu dyfuzji. Ta technika czyszczenia powinna być pozostawiona do przygotowywania elektrod w postaci drutów, bądź napyłonych na szkle.

Wyniki badań własnych Autorka przedstawiła na 55 stronach, w 4 podrozdziałach, a na końcu pracy umieściła rozdział „Podsumowanie i wnioski” oraz „Znaczenie biologiczne”. Przedyskutowała w nich wartość i znaczenie otrzymanych wyników.

W rozdziale 8.1 zatytułowanym: „Wyznaczenie stężeń przy pomocy spektroskopii UV-Vis” nasuwa się pytanie: stężenia „czego” będą wyznaczone? Autorka wyznaczyła stężenie peptydu GHK przy użyciu mianowanego roztworu jonów miedzi (II) i dowiodła, na podstawie pasma przy długości fali 606 nm, że stechiometria kompleksu jest 1:1 a tworzona w pH 6,2 struktura, to forma 3N. Chciałabym prosić w tym miejscu o podanie argumentacji co do wyboru roztworu buforowego do pomiarów stężenia peptydu GHK, a w zasadzie kompleksu Cu(II)GHK, ponieważ w dalszej części pracy dowiedziono, że związki zawierające ugrupowania $-SO_3H$ (takie jak HEPES a zatem i MES) mogą redukować jony Cu(II).

Kolejny rozdział (8.2) dotyczy właśnie badania wpływu środowiska na przebieg reakcji kompleksu binarnego Cu(II)GHK z glutationem. Pomiary prowadzono w roztworach o pH 7,4 w temperaturze 37°C w buforze HEPES oraz w buforze fosforanowym. W opisie eksperymentu nie podano stężenia buforu HEPES, ta informacja pojawia się dopiero w podpisie pod rysunkiem 28. Po dodatku roztworu glutationu do roztworu kompleksu Cu(II)GHK obserwowano na widmie zmiany w postaci zaniku i odtwarzania sygnału przy 606nm oraz pojawiania się i zaniku sygnału CT przy długości fal 250 - 300nm. Z powodu wysokiej wartości molowego współczynnika absorpcji wartość absorbancji przekracza 1. Pokusiłabym się o przeprowadzenie eksperymentu stosując niższe stężenia reagentów i obserwować właśnie okolice pojawiających się sygnałów CT. Dzięki temu, być może, nie byłoby wątpliwości w kwestii położenia pasm CT ($S \rightarrow Cu(I)$). Ze zgrubnego szacowania na podstawie rysunku 29 nie jestem pewna czy pierwsze pasmo faktycznie znajduje się przy długości fali 255nm, czy raczej 260nm. Utrudniona była interpretacja widm różnicowych z rysunku 29 ze względu na różny punkt początkowy tych widm. Dlaczego widmo oznaczone linią czerwoną rejestrowane po 40 minutach od dodatku glutationu, a mające pomóc śledzić postęp reakcji, jest różnicą pomiędzy widmem po 40 minutach a widmem w czasie 0, natomiast w przypadku pozostałych widm - oznaczonych linią czarną i niebieską jako punkt początkowy zastosowano widmo kompleksu Cu(II)GHK bez dodatku glutationu. Rozumiem, że zabieg ten miał jakiś cel i chciałabym prosić o wytłumaczenie tego w czasie publicznej obrony. Nie wiem, czy rysunek 30 jest wykonany na podstawie danych z rysunku 28, ale jeśli tak, to w przypadku sygnału przy długości fali 300nm absorbancja po 40 minutach od dodatku GSH ustala się na poziomie 0,3 natomiast na rysunku 28 obserwacja krzywej czerwonej, która wydaje się być widmem rejestrowanym po 40 minutach wskazuje, że przy długości fali 300nm absorbancja jest na poziomie nieco bardziej

zblizonym do 0,5. Być może moje obserwacje byłyby inne a różnice bardziej widoczne, gdyby rysunek 28 przedstawić jako dwa rysunki, czyli widmo w zakresie długości fal 240-450nm oraz 400-850 nm.

Dzięki eksperymentom przy użyciu kwasu bitycynoninowego Autorka udowodniła zajście procesu redukcji miedzi(II) w kompleksie za pomocą glutationu oraz ponownego utleniania tlenem z powietrza do formy +2. Na tym etapie badań Autorka dowiodła, że stosowanie buforu HEPES do badań związków miedzi (II) nie jest właściwe ze względu na możliwość zachodzenia reakcji pobocznej, prowadzącej do częściowej redukcji jonów miedzi (II). Czy na tym etapie możliwe jest porównanie przez mgr inż. Ufnalską stałych trwałości kompleksów dla kompleksu Cu(I)BCA_2 Cu(I)GSH oraz Cu(II)GHK , czy takie dane poza daną ze strony 92 dla Cu(II)GHK są dostępne?

Na wcześniejszych stronach rozdziału 8.2 Autorka sugerowała, że pasma CT związane są z przeniesieniem ładunku ($\text{S} \rightarrow \text{Cu(I)}$), natomiast na stronie 89 wskazuje odwrotny kierunek przeniesienia ($\text{Cu(I)} \rightarrow \text{S LMST}$), w związku z czym proszę o wyjaśnienia.

W rozdziale 8.3 Autorka omawia inne czynniki wpływające na przebieg reakcji glutationu z kompleksem peptydowym miedzi (II) takie jak: ewentualne kompleksowanie jonów miedzi (II) przez utlenioną formę glutationu - GSSG, obecność tlenu i stężenie glutationu. Dowodzi tu niezaprzeczalnego udziału tlenu w reakcji odtwarzania jonów miedzi (II) po procesie redukcji przy użyciu SGH.

Mechanizm redukcji kompleksu Cu(II)GHK przez GSH dyskutowany jest w kolejnym rozdziale – 8.4. Autorka zaproponowała obniżenie temperatury prowadzenia reakcji, co znacznie spowolniło proces redukcji, ponownego utleniania oraz wpłynęło na wydajność procesu. Pomiar prowadzone przez dr hab. Simona Drewa, metodą elektronowego rezonansu paramagnetycznego, potwierdziły wnioski Autorki płynące z pomiarów w niższych temperaturach i obserwacji hipsochromowego przesunięcia pasma d-d. Wyniki te potwierdziły także istnienie formy zawierającej inny niż woda ligand i jednocześnie dowiodły istnienia zarówno nietrwałego kompleksu ternarnego z GSH jak i kompleksu autoternarnego. Kolejno, Autorka zastosowała do zbadania reakcji redukcji kompleksu Cu(II)GHK inne niż GSH tiol. Co prawda, pomiary z pozostałymi badanymi tiolami prowadzone były w różnych temperaturach, to wykazały podobne przesunięcie hipsochromowe pasma d-d oraz obecność nowego sygnału w okolicy 345nm, co widać na rysunku 50, gdzie brakuje podpisu do wykresu wewnętrznego („insetu”). Dowiadujemy się co jest na tym rysunku dopiero na stronie 130. Pomiary z zastosowaniem spektroskopii jądrowego rezonansu magnetycznego wykonane i przeanalizowane przez współpracowników pozwoliły potwierdzić stechiometrię kompleksu zredukowanych jonów miedziowych z glutationem. W tym miejscu chciałabym zauważyć pewną niekonsekwencję, polegającą na tym, że rysunki z pomiarów metodą spektroskopii EPR, wykonane przez inną osobę niż Doktorantkę umieszczono w Załączniku a jedynie wnioski znalazły się w głównym tekście, natomiast w przypadku wyników otrzymanych metodą NMR nie wykonano takiego zabiegu.

Zastąpienie cząsteczki wody w sferze koordynacyjnej kompleksu Cu(II)GHK przez imidazol doprowadziło do przesunięcia pasma d-d o 41nm w kierunku ultrafioletu, co było zgodne z oczekiwaniami, ale nie obserwowano zmian szybkości redukcji jonu centralnego. Natomiast zastosowanie modelu peptydu typu ATCUN wskazało na istnienie większej liczby ścieżek redukcji kompleksu przez GSH. Autorka przeprowadziła pomiary oddziaływania kompleksu Cu(II)GHK z GSH w obecności imidazolu o różnych stężeniach, w obniżonej względem poprzednich eksperymentów temperaturze o 17°C. Wyznaczyła stałe szybkości reakcji redukcji centrum metalicznego skoordynowanego przez GHK oraz imidazol. Umieszczenie imidazolu w czwartym miejscu koordynacyjnym jonu

miedzi (II) spowolniło reakcję dwukrotnie, ponownie sugerując, że kompleks ternarny z glutationem nie jest jedyną możliwą drogą redukcji jonu miedzi (II). W celu wyznaczenia wartości stałej tworzenia kompleksu ternarnego GSH-Cu(II)GHK Autorka przeprowadziła analizę widm kompleksu Cu(II)GHK w obecności GSH o różnym stężeniu w temperaturze 5°C. By wyznaczyć wartości stężenia odpowiednich form kompleksu ternarnego oraz ich składowych, wyznaczono odpowiednie wartości molowego współczynnika absorpcji przy długościach fal 300 i 345 nm. Na podstawie wyznaczonej stałej tworzenia wyznaczono procentowy udział poszczególnych form kompleksu Cu(II) a zawartość kompleksu ternarnego z GSH wyniosła 40% w nieobecności imidazolu i zmniejszyła się znacząco w jego obecności potwierdzając inne drogi redukcji jonów miedzi niż tylko użycie kompleksu ternarnego z GSH jako substratu tej reakcji.

W przypadku danych elektrochemicznych pokusiłabym się o dogłębnierze zbadanie procesu redukcji jonów miedzi (II) w kompleksie z GHK. Mam wrażenie, że gdy skala czasowa eksperymentu jest krótka, to po procesie redukcji Cu(II) do Cu(I) i zmianie kierunku polaryzacji, następuje utlenianie tych jonów ponownie do Cu(II), co obserwujemy jako sygnał dyfuzyjny. Jeśli zaś szybkość polaryzacji zostaje zmniejszona, to możliwa jest obserwacja reakcji dysproporcjonowania Cu(I) do Cu(II) oraz Cu(0) i to właśnie forma metaliczna jest adsorbowana na elektrodzie, dając charakterystyczny, ostry pik. Nie do końca przemawia do mnie również opis procesu utleniania jonów miedzi (II) do miedzi (II), ponieważ sygnał ten jest nieproporcjonalnie wysoki w stosunku do sygnału redukcji Cu(II) do Cu(I). Zatem, poza nakładaniem sygnału utleniania do formy miedzi (III) i sygnału dekompozycji elektrolitu wydaje się, że dochodzi przy potencjale utleniania centrum metalicznego do katalitycznego utleniania histydyliny z peptydu GHK, skąd podwyższenie natężenia prądu i brak pików reakcji przeciwnej.

Na stronie 136 znajduje się odniesienie do rysunku S35A, którego w pracy nie ma.

Dodatek GSH do roztworu przede wszystkim wskazuje na redukcję przez ten reduktor jonów miedzi (II), ale również natychmiastowe ich kompleksowanie, zarówno tych pochodzących z redukcji chemicznej jak i elektrochemicznej, co uwiadcza się brakiem sygnału utleniania Cu(I). Reakcji kompleksowania dowodzi również przesunięcie pików redukcji w stronę potencjałów mniej ujemnych, zatem w stronę łatwiejszej redukcji. W celu śledzenia postępu reakcji i zmian położenia pików redukcji poleciłabym zastosowanie technik pulsowych a w szczególności normalnej woltamperometrii pulsowej z krótkimi czasami pulsu. Szkoda, że Autorka nie pokazała krzywych cyklicznych po rozszczelnieniu naczynka i dostępu tlenu.

Kilka uwag edytorskich, o których nie wspomniałam wcześniej:

- ogólna uwaga do wykresów prezentowanych w niniejszej pracy związana jest z wielkością znaczników oznaczających punkty pomiarowe. Tak duży rozmiar czasem powoduje, że wykresy stają się nieczytelne, np. na rysunku 44, czy 49.
- w języku polskim separatorem dziesiętnym jest przecinek nie kropka
- nie powinno się raczej zostawiać jednego zdania na kolejnej stronie i reszty strony pustej, ponieważ takie działanie nie robi dobrego wrażenia

Mimo tych kilku drobnych uwag, oceniając edytorską stronę dysertacji chciałabym pochwalić mgr inż. Iwonę Ufnalską za wyjątkową staranność podczas edycji pracy, znalazłam zaledwie kilkanaście literówek i potknięć w całej pracy. Całość dysertacji jest estetyczna, spójna i przejrzysta.

Podsumowując, mgr inż. Iwona Ufnalska dokonała interesującego wyboru tematyki badawczej, zarówno pod względem aktualności jak i atrakcyjności. Uzyskane wyniki z pewnością będą użyteczne w dalszym wyjaśnianiu zjawisk zachodzących w komórkach.

Najważniejsze osiągnięcia badawcze Doktorantki to:

- przeprowadzenie badań spektroskopowych oraz elektrochemicznych w celu opisanie oddziaływania jonów miedzi (II) skompleksowanych peptydem GHK z glutationem
- udowodnienie tworzenia kompleksu ternarnego GSH-Cu(II)-GHK, wyznaczenie stałej równowagi tworzenia tego kompleksu, wyznaczenie specjacji poszczególnych form kompleksowych
- opis procesu redukcji Cu(II) do Cu(I) z zastosowaniem zarówno GSH jak i innych tioli, wyznaczenie potencjalnego mechanizmu tego procesu z udziałem kompleksu ternarnego
- opis procesu ponownego utleniania Cu(I) do Cu(II) w obecności tlenu, zaproponowanie możliwego mechanizmu tego procesu.

Autorka ma w dorobku współautorstwo 7 oryginalnych publikacji naukowych, co jest znacznym dorobkiem naukowym jak na ten etap rozwoju naukowego, pomimo że tylko w dwóch jest wiodącym Autorem.

W oparciu o analizę rozprawy stwierdzam, że spełnia ona wymagania stawiane przez Ustawę o Tytule i Stopniach Naukowych z dnia 14 marca 2003r. (Dz U. z 2003, Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami) oraz Rozporządzenie Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzenia czynności w przewodach doktorskich z dnia 26 września 2016r. a także zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim. Wniosuję o przyjęcie pracy i dopuszczenie Pani mgr inż. Iwony Ufnalskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Agnieszka Więtkowska