



Wrocław, 20.01.2022

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Iwony Magdaleny Ufnalskiej pt. „Badanie procesu redukcji jonów Cu(II) związanych z peptydem GHK z udziałem glutationu”

Praca doktorska Pani mgr inż. Iwony Ufnalskiej została wykonana na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Promotorem pracy jest Pan prof. dr hab. Wojciech Wróblewski zaś promotorem pomocniczym pani dr Urszula Wawrzyniak. Przedstawiona mi do oceny rozprawa poświęcona jest istotnemu zagadnieniu, jakim jest redukcja jonów Cu(II) w postaci kompleksu z trójpeptydem GHK występującym naturalnie we krwi, którego rola biologiczna jest tematem licznych badań naukowych. Jedną z prawdopodobnych hipotez mówi o tym, że peptyd ten bierze udział w transporcie jonów Cu(II) w krwiobiegu a przede wszystkim ułatwia redukcję tychże jonów do Cu(I) w procesie transportu miedzi przez błonę komórkową. Zagadnienie to, choć badane przez wiele lat, nie zostało jak dotąd w pełni wyjaśnione. Temat rozprawy pani mgr inż. Ufnalskiej wpisujemy więc w nowoczesne trendy badawcze chemii bionieorganicznej, której jednym z filarów jest poznawanie mechanizmów transportu jonów metali u ludzi.

Rozprawa Doktorantki licząca 166 stron, napisana w języku polskim została przygotowana w klasycznym układzie pracy eksperymentalnej zawierającej wprowadzenie i następujący po nim obszerny wstęp, cel pracy, rozdziały poświęcone stosowanym technikom, aparaturze i odczynnikiem, wyniki badań własnych, podsumowanie i wnioski. Rozprawę wieńczy rozdział pt. „Znaczenie biologiczne”, w którym Autorka bardzo zgrabnie umieszcza wyniki swoich badań w kontekście biologicznym. Do pracy załączony jest krótki suplement, spis publikacji Doktorantki i bibliografia licząca 206 pozycji, które zostały w przeważającej części opublikowane w ostatnim 20-leciu. Do pracy dołączony jest spis używanych skrótów, choć jest on według mnie zbyt skromny wobec ilości stosowanych symboli i skrótów. Całość opatrzona jest 68-oma ilustracjami i 6-oma tabelami. Szczególną uwagę przykuwa sposób przygotowania rozprawy w postaci zgrabnej i estetycznej książki, którą z przyjemnością się czyta.

Wstęp pracy liczący 44 strony jest rozdziałem dość obszernym jak na typowe rozprawy doktorskie, choć nie oznacza to, że jest przeładowany informacjami. Zawiera bowiem wstęp do chemii koordynacyjnej, w którym pojawiają się definicje kluczowych pojęć. Ze względu na miedziową tematykę pracy zabrakło mi tu umieszczenia jonów Cu(II) i Cu(I) w kontekście kwasów Lewisa oraz teorii miękkich i twardych kwasów (HSAB). Jest to szczególnie przydatne dla zrozumienia, istotnych różnic we właściwościach

fizykochemicznych obu stanów utlenienia miedzi. Wstęp do pracy zawiera przede wszystkim najistotniejsze informacje na temat roli miedzi w ludzkim organizmie, a także jej chemii koordynacyjnej oraz informacje o peptydach jako ligandach jonów miedzi. Szczególny nacisk jest tu położony na peptydy zawierające resztę histydyny w różnych pozycjach w sekwencji aminokwasowej, w tym peptyd GHK, któremu poświęcona jest rozprawa. Autorka zawarła tu również informację na temat glutationu i jego kompleksów z miedzią (brak podanej struktury) a także poznanych i opisanych dotąd miedziowych kompleksów ternarnych.

Cele pracy zostały umieszczone w krótkim, półstronicowym rozdziale w sposób bardzo przejrzysty. Jedyna moja uwaga dotyczy tego, że rozdział napisany jest głównie w czasie przeszłym i bardziej wpasowuje się w konkluzje aniżeli cele płynnie wynikające ze wstępu rozprawy. W rozdziale „Techniki stosowane w pracy” oraz „Aparatura i odczynniki” Autorka umieściła podstawowe informacje na temat technik badawczych stosowanych podczas realizacji projektu. Informacje te są jednak bardzo teoretyczne i praktycznie, brak jest tu detali dotyczących samych eksperymentów i warunków ich prowadzenia. W rozdziale „Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego” zabrakło informacji na temat tego czym są eksperymenty DOSY, które były stosowane podczas charakterystyki produktów reakcji redukcji kompleksu Cu(II)-GHK.

Najistotniejszy rozdział pracy to „Wynik badań własnych”. Na początku chciałbym zaznaczyć, że rozdział ten powinien informować o tym, że zawiera on rezultaty i dyskusję, gdyż w rozprawie nie ma osobnego rozdziału dotyczącego dyskusji uzyskanych wyników. Opis rezultatów rozpoczyna się od skrupulatnej prezentacji tego, w jaki sposób były wyznaczane stężenia reagentów oraz przedstawia od czego mogą pochodzić potencjalne błędy w ich oznaczeniu. Jest on pełen rad i z pewnością powinien być obowiązkową lekturą dla początkujących adeptów chemii bionieorganicznej. Równie pouczające są obserwacje dokonane we wstępnych badaniach, w których Doktorantka wykorzystywała najpierw bufor HEPES, następnie bufor fosforanowy tak, by konkludując swoje próby, zastosować ostatecznie w badaniach układ niebuforujący (woda) doprowadzony do odpowiedniego pH ręcznie. Sugeruję by podczas prezentacji, Autorka w postaci choćby jednego slajdu mogła przedyskutować powody, dla którego wybrała takie a nie inne warunki eksperymentalne. Z opisu wstępnych badań nad reakcją redukcji kompleksu Cu(II) z peptydem GHK w obecności glutatjonu wynika, że Cu(II) jest redukowana do Cu(I), co zostało potwierdzone w teście z kwasem bicynchoninowym. Glutation (GSH) zostaje utleniony do GSSG a powstała Cu(I) jest stabilizowana przez nadmiar GSH, a w miarę jego konsumpcji zostaje utleniona do Cu(II). Procesowi oksydacji kompleksu Cu(I)-GSH towarzyszy odtworzenie pierwotnego kompleksu z GHK. Autorka konkluzje te wyciąga na podstawie spadku, wzrostu lub przesunięć pasm d-d oraz LMCT obserwowanych na widmach elektronowych. O ile ten opis jest zrozumiały i wyciągane konkluzje jasne, niezrozumiałe jest jednak pojawianie się słabego pasma przy 410 nm. Brak jest wyjaśnień czy hipotez od czego to pasmo może pochodzić. Tu prosiłbym o krótką dyskusję. Ciekawy jest również przebieg zmian absorpcji w czasie prezentowany na Rysunku 20. Pasma przy 255 i 606 nm zdają się jasno potwierdzać ten sam scenariusz zachodzących reakcji, podczas gdy zmiany absorpcji rejestrowane przy 300 nm ukazują nieco inny przebieg. Z czego on wynika? Ciekawą obserwacją jest również prawdopodobny proces utleniania składników buforu

HEPES przez jony Cu(II) w obecności ligandów wiążących Cu(I) (Rysunek 32). O ile utlenianie składników buforu HEPES jest zrozumiałe i tym samym zrozumiała jest wzrost absorpcji przy 562 nm prezentowany na Rysunku 32, o tyle mniej jasny jest wzrost absorpcji w obecności buforu fosforanowego (Rysunek 33). Przyrost ten jest w prawdzie kilkukrotnie mniejszy ale dobrze zauważalny. Z czego on może wynikać?

Kolejnym istotnym etapem badań było sprawdzenie tego, czy opisywane reakcje asocjacji, dysocjacji, redukcji i utleniania zachodzą w sposób odwracalny. Jak sama Autorka pisze jest to bardzo ważne z punktu widzenia transportu jonów miedzi i roli samego peptydu GHK. Przeprowadzone pomiary pokazały, że faktycznie zachodzi tu pełna powtarzalność cykli redoks obserwowana po dodaniu kolejnych porcji GSH. Co ważne powstający GSSG nie stanowi tu problemu z punktu widzenia kompetycji do jonów Cu(II) ze względu na znacznie niższe powinowactwo w porównaniu do peptydu GHK. Ponadto, zarejestrowane widma MS również nie wskazywały na pojawianie się produktów ubocznych reakcji.

W dalszej części pracy Autorka skupiła się na początkowych etapach reakcji zachodzących po podaniu GSH do kompleksu Cu(II)-GHK. Przesunięcie pasm d-d obserwowane tuż po dodaniu GSH wskazuje na istnienie krótkotrwałej formy przejściowej. Aby móc badać ten szybko zachodzący proces Autorka podjęła próbę spowolnienia tego procesu. Możliwe było to za sprawą obniżenia temperatury z 37°C do 20°C i 5°C, co skutkowało kilkukrotnym wydłużeniem czasu życia formy pośredniej. Obniżenie temperatury spowodowało również wzrost wydajności reakcji. Czy wynika to ze zmiany równowag w niższej temperaturze czy większego, czasowego rozdzielania nakładających się na siebie reakcji redukcji i utleniania? Zdecydowanie najciekawszą obserwacją fazy redukcji kompleksu dzięki zastosowaniu niższej temperatury była obserwacja przesuwania się pasm d-d w kierunku fal krótszych o około 10-12 nm. Efekt ten jednak jest krótkotrwały i utrzymuje się zaledwie 10 min po czym pasma d-d nieznacznie przesuwają się w kierunku fal dłuższych. Skrupulatna obserwacja zarówno zmian w długości fal maksimum jak i zmian intensywności pasm na widmach pozwoliła na wyciągnięcie konkluzji o obecności dwóch form kompleksowych, różniących się sposobem koordynacji. Według Autorki najbardziej krótkotrwałą formą ternarną jest kompleks Cu(II) z GHK i glutationem. Przemawia za tym wspomniane wyżej i nieopisane dotąd w literaturze przesunięcie hipsochromowe powstałe na skutek substytucji donora tlenowego cząsteczki wody na donor siarkowy cząsteczki glutationu. Drugi kompleks, który powstaje wraz z nim, choć jest odpowiedzialny za przesunięcie batochromowe jest kompleksem binarnym Cu(GHK)₂, w którym czwarte miejsce w płaszczyźnie ekwatorialnej stanowi donor azotowy reszty histydyny od drugiej cząsteczki peptydu {3N+1}. O słuszności tej konkluzji mają świadczyć zarejestrowane widma EPR. Szkoda, że zabrakło ich w głównym tekście. Pomogłyby one nadażyć za tokiem rozumowania Doktorantki a odsyłanie czytelnika do suplementu zaburza nieco jasność przekazu. Rozumiem, że były one rejestrowane przez współpracownika, ale mają jednak bardzo istotny wkład w prezentowane wyniki. Bardzo zainteresował mnie Rysunek 47, który przedstawia rozkład form kompleksów tworzących się w ciągu pierwszej godziny po dodaniu GSH do kompleksu Cu(II)-GHK. Choć sama Doktorantka pisze o nim, że jest on bardziej jakościowy niż ilościowy to niemniej jednak prezentuje bardzo dobrze heterogenność układu. W ilustracji tej brakuje mi formy Cu(I)-GSH, która musi pojawiać się w układzie. Wynika to pewnie z tego, że intencją Autorki było przedstawienie

jedynie form obserwowanych na widmach EPR. Z czystej ciekawości chciałbym poprosić Doktorantkę o choćby minimum informacji na temat tego, jak dane EPR mogą być transformowane w sposób ilościowy/półilościowy do tego typu rozkładu form kompleksowych. Kolejna rzecz, która mnie intryguje to samo pojawianie się kompleksu Cu(II)-(GHK)_2 . Patrząc na Rysunek 47 można wywnioskować, że kompleks 1:2 tworzy się z kompleksu 1:1 przy obecności tej samej ilości peptydu GHK. Rozumiem, że redukcja wyjściowego kompleksu powoduje, że część peptydu zaczyna istnieć w roztworze w postaci wolnej, tym samym promując pojawienie się kompleksu binarnego $\{3\text{N}+1\text{N}\}$, czy tak? Prezentacja wszystkich form, nawet wolnego peptydu, pomogłaby w łatwiejszym zrozumieniu tego dynamicznego układu. Ciekawym dopełnieniem badań nad powstawaniem i charakterystyką struktur kompleksów ternarnych było użycie w reakcji redukcji innych merkaptanów takich jak soli sodowej metanotiolu czy 2-merakptoetanolu. Mimo pewnych różnic pomiędzy nimi ogólne konkluzje uzyskane z ich zastosowania są spójne i wskazują na obecność donora siarkowego w sferze koordynacyjnej najmniej trwałego kompleksu ternarnego bez względu na rodzaj merkaptanu. Wskazują one również na rozbieżność procesu redukcji od obecności donorów azotowych w strukturze merkaptanu. Myślę, że kropkę nad „i” postawiłoby tu użycie N-acetylo-glutationu, który jest najwierniejszym analogiem GSH z niefunkcyjną koordynacyjnie grupą aminową, a może i też S-metyloglutationu pozbawionego ugrupowania SH. Niemniej jednak uzyskane wyniki są bardzo wartościowe i wskazują, że proces redukcji centrum metalicznego kompleksu z GHK zachodzi wolniej niż reakcja substytucji cząsteczki wody grupą tiolową GSH lub to, że istnieje więcej niż jedna ścieżka transferu elektronu. Proszę Doktorantkę by mogła nieco bardziej obrazowo zaprezentować tą ostatnią konkluzję podczas swojego referatu.

Bardzo wartościowym etapem prac Doktorantki było zastosowanie techniki NMR. Ze względu na to, że kompleksy Cu(II) są paramagnetyczne, użycie tej techniki sprowadziło się do charakterystyki form Cu(I) , która jest diamagnetyczna. Przeprowadzone pomiary jednoznacznie wskazują na to, że Cu(I) w układzie nadmiaru GSH występuje jedynie w postaci kompleksu z reduktorem (GSH) o czym świadczą przesunięcia protonów reszty cysteinowej glutationu i brak przesunięć chemicznych protonów pochodzących od peptydu GHK. Oprócz analizy jednowymiarowej przeprowadzono również pomiary dyfuzyjne DOSY. Zastosowanie tego typu eksperymentu pozwoliło na rozróżnienie trzech indywidualnych różniących się parametrami dyfuzyjnymi. Najwolniej dyfundującą formą był kompleks Cu(I)-GSH . Zastosowanie odpowiednich obliczeń pozwoliło Doktorantce i współpracownikowi na określenie objętości kompleksu Cu(I) , który pozostawał trzykrotnie większy od cząsteczki GSSG. Taka sytuacja jest możliwa jedynie, gdy GSH tworzy kompleks klastrowy z Cu(I) o stechiometrii $\text{Cu}_4(\text{GSH})_6$. Jest to bardzo wartościowy wynik, gdyż dotąd tworzenie się takiego kompleksu było potwierdzone jedynie badaniami spektroskopowymi i sedymentacyjnymi.

Ostatnia część pracy badawczej to wyznaczenie stałej trwałości kompleksu ternarnego oraz charakterystyka właściwości elektrochemicznych badanych układów. Zdecydowanie chylę czoła nad zastosowaną procedurą pozwalającą na dokładne wyznaczenie stałej tworzenia kompleksu ternarnego. Znajomość wartości tej stałej pozwala na obliczenie dystrybucji form kompleksowych miedzi w dowolnych

warunkach reakcji, różniących się składem/stężeniami reagentów. Sugeruję Doktorantce by tą część wniosków przedstawić podczas prezentacji w nieco inny sposób niż prezentuje to Tabela 6. Zastosowanie całej procedury jest bardzo skomplikowane ale jej efekt bardzo wartościowy. Profil zmian elektrochemicznych uzyskanych przez Autorkę jest spójny z badaniami spektroskopowymi. Zaobserwowane przesunięcie sygnału katodowego w kierunku dodatnich potencjałów dla pierwszych minut reakcji redukcji wskazuje na to, że proces ten może zachodzić w warunkach fizjologicznych a dokładniej w fizjologicznym oknie zmian potencjału redoks. Sugeruje to mocno, że tworzenie się kompleksów ternarnych może odgrywać istotną rolę w licznych procesach biologicznych dzięki modulacji właściwości redoks. Jest to zdecydowanie istotne dla kompleksów jonów miedzi a także innych aktywnych redokso- jonów metali.

Rozprawę doktorską Pani mgr inż. Ufnalskiej wieńczy rozdział „Podsumowanie i wnioski” a także „Znaczenie biologiczne”. Autorka umieściła tam najistotniejsze wnioski i spostrzeżenia uzyskane podczas realizacji projektu w kontekście biologii miedzi a także badanych peptydów. Rozdziały te napisane są jasno i świadczą o dojrzałości badawczej Autorki.

Poza uwagami umieszczonymi wyżej, nie mam zasadniczych zastrzeżeń merytorycznych do recenzowanej rozprawy. Pracę czyta się z przyjemnością mimo, że opisuje ona niełatwe w realizacji i prezentacji badania chemiczne z zastosowaniem różnych technik pomiarowych. Dość trafnym podejściem Autorki było rozpoczynanie kolejnych etapów pracy od podsumowania najistotniejszych wyników uzyskanych do tej pory, które były istotne dla czytelnika w zrozumieniu kolejnych kroków. Mimo, że takie podejście generuje pewne powtórzenia to zdecydowanie ułatwia czytanie rozprawy. Cała praca napisana jest poprawnym językiem choć Autorka nie uniknęła pewnych błędów gramatycznych i zwyczajowych. W niektórych miejscach obecne są powtórzenia wyrazów, niewłaściwe słowa lub nawet niedokończone zdania. Domyślam się, że wynikało to z pośpiechu na ostatnich etapach edycji. Zdecydowanie nie jestem zwolennikiem umieszczania w rozprawach napisanych w j. polskim rysunków i tabel, które zawierają kropki zamiast przecinków. Wymienione błędy edytorskie, choć pojawiają się w całej pracy nie wpływają znacząco na bardzo pozytywny odbiór całej rozprawy, walorów naukowych a także bardzo przystępnego sposobu przekazywania informacji i opisu uzyskanych wyników.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr. inż. Iwony Magdaleny Ufnalskiej spełnia wymogi ustawowe, stanowi oryginalne rozwiązanie naukowe, wykazuje wiedzę teoretyczną Autorki jak i umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. W związku z powyższym wnoszę o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr inż. Iwony Ufnalskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Z wyrazami szacunku

Artur Krężel

