

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Emilii Nieczyporowskiej

pt

„Synteza, kinetyka i mechanizmy reakcji in vitro kompleksów chromu(III) z aminokwasami stanowiących potencjalne źródło biochromu ”

Badania roztworowe związków posiadają wyjątkowe znaczenie szczególnie w analizie układów o odniesieniu biologicznym. Zespół p. prof. Ewy Kity na Wydziale Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, pod której opieką p. mgr Emilia Nieczyporowska wykonywała pracę doktorską, od wielu lat zajmuje się problematyką związków koordynacyjnych chromu(III) w roztworach w aspekcie kinetyki i mechanizmu zachodzących reakcji.

Chrom należy do metali użytkowych ale w przeciwieństwie do innych pierwiastków szeregu 3d poglądy na temat jego roli biologicznej od wielu lat stanowią źródło kontrowersji, która dotyczy przede wszystkim trzeciego stopnia utlenienia tego pierwiastka

Trzy daty są ważne w aspekcie tematyki omawianej rozprawy: 1759r. - odkrycie chromu, 1890 r. –pierwsza informacja o rakotwórczym działaniu pigmentów chromowych oraz 1959r.- doniesienie, że chrom(III) w formie kompleksu m.in. z kwasem nikotynowym jest niezbędny dla organizmów żywych , stanowiąc tzw. czynnik tolerancji glukozy (GTF). Ten ostatni wniosek okazał się bardzo kontrowersyjny natomiast jak wykazały późniejsze badania, niektóre związki chromu(III) w przypadku dawek farmaceutycznych, mogą odgrywać ważną pozytywną rolę.

Dziś wiemy, że Cr(III) w odróżnieniu od jonów żelaza, miedzi czy cynku, nie jest jonem niezbędnym dla organizmów żywych (biopierwiastkiem). W 2014 roku został usunięty z listy EFSA (europejska lista bezpieczeństwa żywności) [Vincent J.B. Biol.Trace Elem Res 166, 7 (2015)]. Jednak działanie farmakologiczne Cr(III) (suplementy, leki) stanowi przedmiot dalszych intensywnych badań zarówno eksperymentalnych jak i teoretycznych [M.K.Uddin, praca doktorska, Murdoch University (2017)].

Co wiemy na pewno:

1. Toksyczność i mutagenność dotyczy nie tylko wyższych stopni utlenienia czyli Cr(VI), Cr(V) czy Cr(III) ale również Cr(III) oraz prawdopodobnie także Cr(II). Cr(III) wiąże się do DNA a także może ulegać reakcji typu Fentona tworząc reaktywne rodniki. Cytotoksyczność Cr(III) zależy od skoordynowanego liganda, stężenia i czasu ekspozycji. Na przykład, związki Cr(III) z histydyną i szczawianem jako ligandami nie są kancerogenne. Inaczej jest z trójdzielnym kompleksem Cr(III) z anionem octanowym oraz kompleksem chromu z anionem pikolinianowym, określanym jako pikolinian chromu, popularnym suplementem [J.D. van Horn et al., J.Inorg. Biochem. 99(2005) 787]. Należy podkreślić, że Cr(III) może przechodzić do bardziej labilnych, wyższych stopni utlenienia czyli Cr(IV), Cr(V) i stabilnego Cr(VI) także w warunkach biologicznych. Dziś wiemy, że niedawny podział na „złe” (Cr(VI)) i „dobre” (Cr(III)) związki chromu jest niewystarczający gdyż w samym Cr(III) „są obecni” Dr Jekyll i Pan Hyde (nawiązując do opowiadania Roberta Louisa Stevensona). Stąd bardzo ważna staje się specjacja związków chromu.
2. Jest relacja pomiędzy jedyną znaną biologiczną formą Cr(III) jaką jest chromodulina (LMWCr), oligopeptyd złożony z czterech jonów chromu(III) oraz z 10- 11 aminokwasów, a hormonem insuliną. Stwierdzono, że w obecności chromu(III) następuje poprawa metabolizmu glukozy przez insulinę. W literaturze użyto nawet określenia chromoduliny jako kofaktora insuliny ale wydaje się, że hipoteza działania Cr(III) jako biologicznego tzw wtórnego przekaźnika (ang. second messenger) jest właściwszym określeniem jego roli. Według tej hipotezy Cr(III) reaguje na zmiany stężenia insuliny wzmacniając jej czułość na glukozę poprzez stymulowanie

aktywności kinazy receptora insuliny [Vincent J.B. Biol.Trace Elem Res 166, 7 (2015)].

Ta ostatnia informacja będąca ciągle jeszcze hipotezą, otwiera drogę do poszukiwania nowych leków i suplementów na bazie chromu(III) ze ściśle kontrolowanymi ligandami i dawkowaniem.

Rozważając rolę chromu czy jakiegokolwiek pierwiastka należy pamiętać o trzech paradygmatach Waltera Mertza, jednego z odkrywców GTF. Pierwszy z nich dotyczy udziału innych składników w ocenie roli danego pierwiastka (efekt pełnej diety), drugi paradygmat stwierdza, że niezbędność, toksyczność czy obojętność danego składnika diety nie są cechami absolutnymi gdyż istotna jest rola wielkości dawki, a trzeci, że dopiero długofalowe badania pozwalają na rzetelną ocenę działania suplementu [Nutr.Rev. 51, 287 (1993)].

Aktualnie ze względu na fakt, że efekty suplementacji pikolinianem chromu są niejednoznaczne, przesunięto ten związek z poziomu najwyższej rekomendacji do niższego obok ryboflawiny czy fosfonianów. W Europie kontynentalnej dozwolona dawka pikolinianowego kompleksu Cr(III) to 250 µg/dzień podczas gdy w Anglii 10 µg/dzień. W opinii recenzentki, powinno się go wycofać ze sprzedaży do czasu pełnego wyjaśnienia jego działania.

Pamiętając o „dobrych” i „złych” związkach Cr(III) praca doktorska p. mgr Nieczyporowskiej dotyczy poszukiwań nowych, bezpiecznych jego form, które mogłyby w przyszłości zastąpić obecne suplementy tego pierwiastka (m.in. kontrowersyjny kompleks pikolinianowy).

Praca jest obszerna, zawiera 243 strony oraz 107 odnośników literaturowych. W tych ostatnich 40% stanowią publikacje z ostatnich 5 lat. Rozprawa jest oparta na 6 oryginalnych artykułach opublikowanych w latach 2013-2017.

W nawiązaniu do farmakologicznej roli chromu(III) Doktorantka postawiła sobie za cel zbadanie reaktywności in vitro związków Cr(III) w roztworach gdyż jest to klucz do zrozumienia ich zachowań w warunkach fizjologicznych.

Dwa główne tematy rozprawy z tym związane to:

1. Kinetyka i mechanizm reakcji hydrolitycznych form kompleksowych Cr(III)

w pH niskim (roztwory kwaśne) i wysokim (alkaliczne).

2. Reakcje z H_2O_2 (nawiązujące do problemu zmiany stopnia utlenienia Cr(III) w warunkach biologicznych).

Wybór ligandów nie był przypadkowy. Do badań Doktorantka wybrała związki endogenne spełniające ważne role biologiczne: α -aminokwasy (7 spośród 20 wchodzących w skład białek), jon szczawianowy oraz anion kwasu pikolinowego. Aminokwasy pełnią m.in. rolę budulcową dla białek. Jon szczawianowy obok właściwości transportowania jonów metali w roślinach jest inhibitorem enzymu dehydrogenazy mleczanowej (LDH). Enzym ten katalizuje konwersję pirogronianu do kwasu mlekowego, który jest wykorzystywany przez komórki nowotworowe do syntezy ATP. W ten sposób szczawian hamuje rozwój tych komórek. Kwas pikolinowy syntezowany w organizmach przy udziale enzymu karboksylazy pikolinianowej pełni rolę czynnika chelatującego w metabolizmie biometali.

W ramach tematyki części 1-szej Doktorantka zsyntezowała kompleksy proste oraz mieszanoligandowe oraz zidentyfikowała produkty akwatacji poprzez uważne śledzenie zmian w widmach elektronowych tych form. Po rozseparowaniu związków na kolumnie jonowymiennej przeprowadziła pomiary kinetyczne reakcji akwatacji i zaproponowała mechanizmy reakcji.

W drugiej części przeprowadziła utlenienie nadtlaniem wodoru w środowisku silnie alkalicznym i słabo alkalicznym kompleksów prostych i mieszanoligandowych, w tym pikolinianu chromu. Zidentyfikowała produkty przejściowe i finalne oraz zaproponowała mechanizm reakcji redoks.

Niejako uzupełnieniem badań fizykochemicznych było zbadanie cytotoksyczności dwóch form kompleksowych Cr(III): cysteinianu i pikolinianu.

Pragnę zwrócić uwagę na precyzję pomiarów roztworowych poprzedzoną rozseparowaniem mieszaniny form znajdujących się w roztworze metodą kolumnowej chromatografii jonowymiennej a następnie bardzo wnikliwą analizą otrzymanych widm elektronowych w zakresie występowania pasm d-d. Należy podkreślić, że przedmiotem identyfikacji zarówno produktów akwatacji jak i utlenienia były zarówno formy monoligandowe (homoleptyczne) jak i wieloligandowe (heteroleptyczne). Te ostatnie szczególnie w przypadku aminokwasów gdy drugim ligandem była cząsteczka wody, okazały się bardzo nietrwałe i w niektórych

przypadkach należało je badać zaraz po otrzymaniu. Jest to jeden z wielu przykładów obrazujących skalę trudności.

Dobrze się stało, że Doktorantka podjęła ważny choć trudny temat związany z poszukiwaniem bezpiecznych dla organizmu i efektywnych związków Cr(III) a do najważniejszych osiągnięć tej pracy zaliczam:

- Bardzo wnikliwą analizę reakcji hydrolitycznych zarówno układów monoligandowych jak i heteroligandowych łącznie z obserwacją reakcji przebiegających równolegle np. reakcji otwierania dwóch różnych pierścieni czy uwalniania dwóch różnych ligandów. Dodatkowo, wyznaczenie odpowiednich stałych szybkości dla większości etapów zachodzących w obszarach o różnej kwasowości.

- Podanie propozycji mechanizmu rozpadu hydrolitycznego dla wszystkich powstałych w roztworach kompleksów. Szczególne znaczenie posiada reakcja otwarcia pierścienia zaobserwowana dla tych układów jako pierwszy etap.

- Znalezienie wielostopniowego mechanizmu reakcji zachodzących w roztworach. Na przykład, w kompleksie z cysteiną obserwacja niejednoczesnego pękania wiązań Cr-S; najpierw wiązania Cr-S jednego liganda a potem drugiego liganda.

- Ustalenie zależności stałych szybkości od pH dla tych reakcji poprzez podanie odpowiednich wzorów.

- Szczegółowa analiza reakcji redoks zarówno w roztworze NaOH jak i w buforze wodorowęglanowym, najważniejszym buforze w organizmie człowieka.

- Obserwacja hydrolitycznego pękania (otwierania) pierścienia chelatowego jako pierwszego etapu całego procesu. Podano kilka dróg na których zachodzi ten proces. Znalezienie, że kinetyka dalszych etapów reakcji hydrolitycznych i redoksowych jest uzależniona od szybkości ponownego jego zamykania.

- Znalezienie, że utlenianie połączeń Cr(III) może wystąpić już przy pH bliskim fizjologicznego.

- Podkreślenie znaczenia oddziaływań zewnątrzferowych.

-Synteza w fazie stałej dwóch nieznanych dotąd w literaturze związków Cr(III): kompleksu z kwasem asparaginowym oraz alaniną. Każdy związek kompleksowy metalu z tymi ligandami jest istotny zważywszy na rolę aminokwasów białkowych w biologii

-Wytypowanie dwóch form anionowych Cr(III) –kompleksów z cysteiną i kwasem asparaginowym jako potencjalnych suplementów. Jednocześnie ostrzeżenie, że obserwowana szybkość utlenienia do mutagennych form chromu w warunkach zbliżonych do fizjologicznych może przekształcić bezpieczną formę chromu w niebezpieczną.

Niejako na marginesie chciałabym podkreślić szczególne znaczenie w tej pracy najstarszej metody spektroskopowej czyli elektronowej spektroskopii absorpcyjnej i jej rola w identyfikacji poszczególnych form chromu(III) oraz w analizie zawartości tego pierwiastka.

Oto pytania i uwagi, które nasunęły mi się w trakcie lektury tej rozprawy:

1. Brakuje w pracy proponowanych wzorów struktur zarówno związku wyjściowego jak i form pośrednich np. po pęknięciu łańcucha. Ułatwiłoby to jej lekturę. Na szczęście doktorantka zamieściła kilka struktur w publikacjach.
2. W tej rozprawie nie pojawia się Cr(IV) , druga obok Cr(V) metastabilna forma chromu. Czy nie jest znany ten stopień utlenienia w procesie biologicznej transformacji Cr(III)-Cr(VI)?
3. W pracy używane są zamiennie litery S do oznaczania dihydroksokompleksów oraz siarki. Może być to mylące w dyskusji ogólnej.
4. Nie wyjaśniono zupełnie charakteru linii komórkowej 3T3. W pracach oryginalnych symbol 3T3 jest na ogół wystarczający chociaż w niektórych czasopismach trzeba podawać listę skrótów.
5. Według jakiej skali podana jest elektroujemność chromu? (str. 19).
6. Nie podano wyników analizy elementarnej i derywatograficznej stałych związków.
7. Trudno mi przyswoić określenia ligandów dość często używane w polskiej literaturze: jedno-, dwu- i trójkleszczowe. Wolę określenie monodentne, bi- i tridentne choć to nie po polsku. Tak więc woda wiążąc się jedną parą elektronów

jest ligandem monodentnym (nota bene- po grecku chele-kleszcze są z definicji bidentne).

8. Trochę razi mnie słownictwo np. wytermostatowany roztwór, rozkłady redoksowe i oksydacyjne, fitowanie danych, deelektronacja atomów.
9. Lekturę ułatwiłoby podsumowanie osiągniętych rezultatów przynajmniej po każdej z głównych części tej pracy.

Drobne błędy i literówki, które nieco utrudniały lekturę, przekażę oddzielnie Autorce.

Powyższe uwagi nie wpłynęły na moją pozytywną ocenę tej pracy.

Stwierdzam zatem, że przedstawiona rozprawa całkowicie spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim, a w szczególności odpowiada warunkom określonym w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytułach naukowych.

Wnoszę o dopuszczenie p. mgr Emilii Nieczyporowskiej do publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

Ponadto, stwierdzam, że stopień trudności eksperymentu, znaczące i interesujące wyniki pozwalają mi z pełnym przekonaniem wnioskować do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o **wyróżnienie rozprawy**.

M. Ciarkiewicz