

Nowe metody detekcji reaktywnych form tlenu i azotu: od badań mechanistycznych do zastosowań w układach biologicznych

Dr inż. Jacek Zielonka

Department of Biophysics, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, USA

Międzyresortowy Instytut Techniki Radiacyjnej, Wydział Chemiczny, Politechnika Łódzka

Załącznik 1

Autoreferat w języku polskim

Autoreferat

Nowe metody detekcji reaktywnych form tlenu i azotu: od badań mechanistycznych do zastosowań w układach biologicznych

Dr inż. Jacek Zielonka

Department of Biophysics, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, USA

Międzyresortowy Instytut Techniki Radiacyjnej, Wydział Chemiczny, Politechnika Łódzka

Spis treści

1. Dane osobowe.....	3
2. Wykształcenie.....	3
3. Dotychczasowe zatrudnienie.....	3
4. Osiągnięcia naukowe zgłoszone jako podstawa do przewodu habilitacyjnego.....	3
5. Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze.....	21
5.1. Spis publikacji niewchodzących w zakres tematyki habilitacyjnej.....	21
5.2. Najbliższe plany badawcze.....	34
5.3. Udział w projektach badawczych.....	35
5.4. Staże naukowe.....	36
5.5. Współpraca międzynarodowa.....	36
5.6. Najważniejsze nagrody i wyróżnienia związane z działalnością naukową i dydaktyczną..	37
5.7. Udział w komitetach redakcyjnych i radach naukowych czasopism.....	37
5.8. Członkostwo w międzynarodowych i krajowych organizacjach oraz towarzystwach naukowych.....	38
5.9. Udział w konferencjach i komitetach organizacyjnych konferencji.....	38
5.10. Recenzowanie publikacji.....	42
6. Działalność dydaktyczna.....	43
7. Udział w zespołach eksperckich i konkursowych.....	43
8. Syntetyczne dane dotyczące dorobku naukowego.....	44

1. Dane osobowe

Imię i nazwisko: **Jacek Zielonka**

2. Wykształcenie

2002 Stopień doktora nauk chemicznych, rozprawa doktorska pt. „*Nietrwałe produkty pośrednie w reakcjach redoks wybranych soli pirydyniowych*”, promotor: prof. dr hab. Jerzy Gębicki, Wydział Chemiczny Politechniki Łódzkiej

1998 Mgr inż. chemii, tytuł pracy magisterskiej: „*Mechanizm utleniania 1,4-dihydronikotynamidu oraz jego hydratu*”, praca wykonana pod kierunkiem prof. dra hab. Jerzego Gębickiego, Wydział Chemiczny Politechniki Łódzkiej

3. Dotychczasowe zatrudnienie w jednostkach naukowych

2011-obecnie *Facility Manager*, Free Radical Research Center, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, Wisconsin

2011-obecnie *Research Scientist II*, Department of Biophysics, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, Wisconsin

2010-obecnie *Konsultant projektu*, Wydział Chemiczny Politechniki Łódzkiej

2007-2011 *Research Scientist*, Department of Biophysics, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, Wisconsin

2004-2007 *Postdoctoral Fellow*, Department of Biophysics, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, Wisconsin

2002-2004 *Adiunkt*, Wydział Chemiczny Politechniki Łódzkiej

4. Osiągnięcia naukowe zgłoszone jako podstawa przewodu habilitacyjnego

a) Tytuł osiągnięcia naukowego

Nowe metody detekcji reaktywnych form tlenu i azotu: od badań mechanistycznych do zastosowań w układach biologicznych

Podstawę osiągnięcia stanowi cykl 13 publikacji i jeden rozdział książkowy współautorstwa habilitanta.

- b) Spis monotematycznych publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe zgłoszone jako podstawa do przewodu habilitacyjnego. Kopie publikacji oraz oświadczenia współautorów zamieszczono odpowiednio w załącznikach 3 i 4.

[H1] J. Zielonka, H. Zhao, Y. Xu, B. Kalyanaraman, Mechanistic similarities between oxidation of hydroethidine by Fremy's salt and superoxide: stopped-flow optical and EPR studies. *Free Radic. Biol. Med.* **2005**, 39, 853-863. IF₂₀₀₄ = **5,625**, wkład własny = **70%**, liczba cytowań: **49**

Moim wkładem jest zaprojektowanie i wykonanie większości pomiarów, w tym wszystkie badania reaktywności chemicznej próbnika HE względem soli Fremy'ego, analiza, interpretacja i dyskusja wyników oraz przygotowanie wszystkich rysunków wstępnej wersji manuskryptu.

[H2] J. Zielonka, J. Vasquez-Vivar, B. Kalyanaraman, The confounding effects of light, sonication, and MnTBAP on quantitation of superoxide using hydroethidine. *Free Radic. Biol. Med.* **2006**, 41, 1050-1057. IF₂₀₀₆ = **5,440**, wkład własny = **80%**, liczba cytowań: **26**

Moim wkładem jest zaprojektowanie i wykonanie większości pomiarów, w tym wszystkich badań utleniania i fotoutleniania próbnika HE w nieobecności komórek, opracowanie metody analizy hydroetydyny i jej produktów utleniania z użyciem chromatografii HPLC z detekcją kulometryczną, współudział w eksperymentach na liniach komórkowych i analiza próbek, analiza, interpretacja i dyskusja wszystkich wyników oraz przygotowanie wszystkich rysunków i wstępnej wersji manuskryptu.

[H3] J. Zielonka, T. Sarna, J. E. Roberts, J. F. Wishart, B. Kalyanaraman, Pulse radiolysis and steady-state analyses of the reaction between hydroethidine and superoxide and other oxidants. *Arch. Biochem. Biophys.* **2006**, 456, 39-47. IF₂₀₀₆ = **2,969**, wkład własny = **60%**, liczba cytowań: **30**

Moim wkładem jest udział w zaprojektowaniu wszystkich pomiarów, wykonanie części pomiarów, w tym wszystkich badań z użyciem odczynnika Fentona (i jego modyfikacji) oraz pułapkowania spinowego, analiza, interpretacja i dyskusja wszystkich wyników oraz przygotowanie wszystkich rysunków i wstępnej wersji manuskryptu.

[H4] J. Zielonka, J. Vasquez-Vivar, B. Kalyanaraman, Detection of 2-hydroxyethidium in cellular systems: a unique marker product of superoxide and hydroethidine. *Nat. Protoc.* **2008**, 3, 8-21. IF₂₀₀₈ = **4,170**, wkład własny = **80%**, liczba cytowań: **117**

Moim wkładem jest zaprojektowanie i wykonanie większości pomiarów, w tym analizy spektroskopowe HE i Mito-HE i ich produktów utleniania, większość analiz chromatograficznych

i ekstrakcja i analiza chromatograficzna HPLC lizatów komórkowych, analiza, interpretacja i dyskusja wszystkich wyników oraz przygotowanie wszystkich rysunków i wstępnej wersji manuskryptu.

[H5] J. Zielonka, S. Srinivasan, M. Hardy, O. Ouari, M. Lopez, J. Vasquez-Vivar, N. G. Avadhani, B. Kalyanaraman, Cytochrome c-mediated oxidation of hydroethidine and mito-hydroethidine in mitochondria: Identification of homo- and heterodimers. *Free Radic. Biol. Med.* **2008**, *44*, 835-846. IF₂₀₀₈ = 5,399, wkład własny = 60%, liczba cytowań: 36

Moim wkładem jest koncepcja pracy, zaprojektowanie i wykonanie większości pomiarów, w tym badań reaktywności chemicznej próbników HE i Mito-HE względem jednoelektronowych utleniaczy i cytochromu c, synteza nowego produktu utleniania HE (dietydyny) oraz opracowanie metodyki analizy próbniaka Mito-HE z użyciem chromatografii HPLC-EC, analiza, interpretacja i dyskusja wyników oraz przygotowanie wszystkich rysunków i wstępnej wersji manuskryptu.

[H6] J. Zielonka, M. Hardy, B. Kalyanaraman, HPLC study of oxidation products of hydroethidine in chemical and biological systems: ramifications in superoxide measurements. *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, *46*, 329-338. IF₂₀₀₉ = 6,081, wkład własny = 80%, liczba cytowań: 48

Moim wkładem jest zaprojektowanie i wykonanie całości pomiarów, w tym opracowanie metodyk chromatograficznych analizy i oczyszczania produktów utleniania próbników HE i Mito-HE, analiza, interpretacja i dyskusja wyników oraz przygotowanie wszystkich rysunków i wstępnej wersji manuskryptu.

[H7] J. Zielonka, B. Kalyanaraman, Hydroethidine- and MitoSOX-derived red fluorescence is not a reliable indicator of intracellular superoxide formation: Another inconvenient truth. *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, *48*, 983-1001. IF₂₀₁₀ = 5,707, wkład własny = 80%, liczba cytowań: 108

Moim wkładem jest koncepcja artykułu i przygotowanie wszystkich rysunków i manuskryptu (artykuł przeglądowy).

[H8] J. Zielonka, A. Sikora, J. Joseph, B. Kalyanaraman, Peroxynitrite is the major species formed from different flux ratios of co-generated nitric oxide and superoxide: direct reaction with boronate-based fluorescent probe. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 14210-14216. **Artykuł wyróżniony jako JBC Paper of the Week.** IF₂₀₁₀ = 5,328, wkład własny = 40%, liczba cytowań: 47

Moim wkładem jest zaprojektowanie i wykonanie części pomiarów, w tym wszystkich eksperymentów kinetycznych reaktywności próbniaka CBA z nadtlenkiem wodoru i nadtlenoazotynem, badania spektroskopowe i chromatograficzne produktów utleniania próbniaka CBA, analiza aktywności oksydazy ksantynowej przy różnych strumieniach tlenu

azotu, udział w badaniach wpływu strumieni $\cdot\text{NO}$ i $\text{O}_2^{\cdot-}$ na wydajność utleniania próbnika CBA, analiza, interpretacja i dyskusja wyników oraz przygotowanie rysunków i wstępnej wersji manuskryptu.

[H9] J. Zielonka, B. Kalyanaraman. "Methods of Investigation of Selected Radical Oxygen/Nitrogen Species in Cell-free and Cellular Systems" in: Principles of Free Radical Biomedicine, Volume 1, K. Pantopoulos and H.M. Schipper (eds). Nova Science Publishers, **2011**. Wkład własny = **90%**

Moim wkładem jest przygotowanie i edycja manuskryptu (całości rozdziału). (Autor korespondencyjny)

[H10] J. Zielonka, M. Zielonka, A. Sikora, J. Adamus, J. Joseph, M. Hardy, O. Ouari, B.P. Dranka, B. Kalyanaraman, Global profiling of reactive oxygen and nitrogen species in biological systems: High-throughput real-time analyses. *J. Biol. Chem.* **2012**, 287, 2984-2995. **Artykuł wyróżniony jako JBC Paper of the Week**. IF₂₀₁₂ = **4,651**, wkład własny = **60%**, liczba cytowań: **37**

Moim wkładem jest zaprojektowanie i wykonanie większości pomiarów, w tym wstępnych badań utleniania próbników w układach enzymatycznych i komórkowych (linii komórkowej makrofagów RAW 264.7), opracowania nowych, krótkich metod chromatograficznych analizy próbników i ich produktów utleniania/nitrozowania, analiza, interpretacja i dyskusja wszystkich wyników oraz przygotowanie rysunków i wstępnej wersji manuskryptu.

[H11] J. Zielonka, A. Sikora, M. Hardy, J. Joseph, B. P. Dranka, and B. Kalyanaraman, Boronate Probes as Diagnostic Tools for Real Time Monitoring of Peroxynitrite and Hydroperoxides. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, 25, 1793-1799. **Artykuł wyróżniony w sekcji redakcyjnej „In This Issue” oraz na okładce czasopisma**. IF₂₀₁₂ = **3,667**, wkład własny = **30%**, liczba cytowań: **20**

Moim wkładem jest wykonanie koniecznych pomiarów i symulacji kinetycznych, przygotowanie rysunków oraz udział w przygotowaniu manuskryptu (artykuł przeglądowy).

[H12] J. Zielonka, J. Joseph, A. Sikora, B. Kalyanaraman, Real-time monitoring of reactive oxygen and nitrogen species in a multi-well plate using the diagnostic marker products of specific probes. *Methods Enzymol.* **2013**, 526, 145-157. IF₂₀₁₃ = **2,194**, wkład własny = **50%**, liczba cytowań: **1**

Moim wkładem jest zaprojektowanie i wykonanie większości koniecznych pomiarów i analiza wyników, przygotowanie wszystkich rysunków oraz udział w przygotowaniu manuskryptu.

[H13] B. Kalyanaraman, B. P. Dranka, M. Hardy, R. Michalski, J. Zielonka. HPLC-based monitoring of products formed from hydroethidine-based fluorogenic probes - The ultimate approach for

intra-and extracellular superoxide detection. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, 1840, 739-744. IF₂₀₁₃ = 3,829, wkład własny = 40%, liczba cytowań: 7

Moim wkładem jest wykonanie koniecznych pomiarów widm fluorescencji, przygotowanie rysunków oraz udział w przygotowaniu manuskryptu (artykuł przeglądowy).

[H14] J. Zielonka, G. Cheng, M. Zielonka, T. Ganesh, A. Sun, J. Joseph, R. Michalski, W. J. O'Brien, J. D. Lambeth, B. Kalyanaraman, High-throughput assays for superoxide and hydrogen peroxide: Design of a screening workflow to identify inhibitors of NADPH oxidases. *J. Biol. Chem.* **2014**, 289, 16176-16189. IF₂₀₁₃ = 4,600, wkład własny = 60%, liczba cytowań: 0

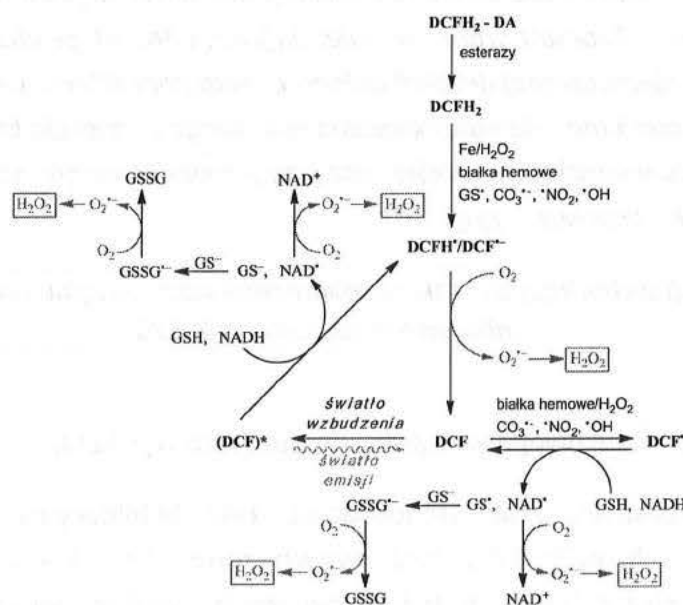
Moim wkładem jest zaprojektowanie wszystkich eksperymentów, wykonanie części pomiarów, w tym współudział w badaniach na liniach komórkowych zdyferencjonowanych komórek HL60 i komórek N27, opracowanie metod analiz utleniania próbników z użyciem czytnika płytek oraz nowych, szybkich metod chromatograficznych detekcji HE, CBA i ich produktów utleniania, opracowanie metody równoczesnej detekcji anionorodnika ponadtlenkowego i nadtlenu wodoru, wykonanie badań metodą pułapkowania spinowego z detekcją EPR, analiza, interpretacja i dyskusja wszystkich wyników oraz przygotowanie wszystkich rysunków i manuskryptu. (Autor korespondencyjny)

Łączny IF publikacji wchodzących w skład monotematycznego cyklu prezentacji to 59,660; całkowita liczba cytowań: 526

c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników.

Przedmiotem wybranych prac stanowiących cykl habilitacyjny jest charakterystyka reaktywności wybranych próbników reaktywnych form tlenu i azotu w kontekście ich zastosowań w układach biochemicznych i biologicznych. Pomimo ponad trzech dekad badań nad udziałem reaktywnych form tlenu i azotu (*RONS*, *reactive oxygen and nitrogen species*, m.in. anionorodnik ponadtlenkowy, nadtlenek wodoru, nadtlendioazotyn) w procesach fizjologicznych i patofizjologicznych, detekcja i oznaczenie ilościowe reaktywnych form tlenu i azotu pozostaje wyzwaniem naukowym. Dotyczy to nie tylko identyfikacji poszczególnych form *RONS*, lecz nawet półilościowego oznaczenia całkowitej puli *RONS* w układach komórkowych. Problem ten w znacznym stopniu ogranicza postęp naukowy w dziedzinie udziału *RONS* w procesach fizjologicznych i patofizjologicznych jak również w mechanizmie działania leków. Najczęściej stosowanym próbniakiem *RONS* jest dihydrodichlorofluoresceina (DCFH₂), powszechnie używana w układach biologicznych (hodowle komórkowe) do oznaczania poziomu *RONS* czy też jako selektywny próbnik na nadtlenek wodoru. Warto tutaj przypomnieć, że próbnik DCFH₂ nie reaguje bezpośrednio z H₂O₂, do reakcji tej potrzebny jest katalizator, np. jony metali przejściowych (np. Fe²⁺) czy białka hemowe (np. peroksydazy czy też cytochrom c).

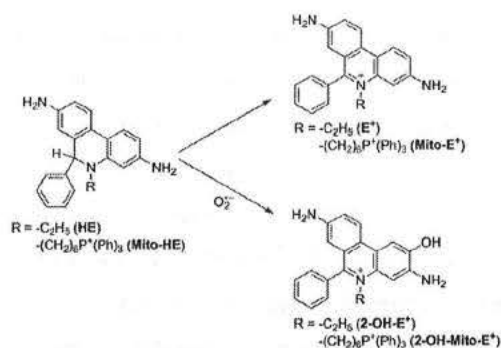
Ponadto w szeregu prac dotyczących chemii DCFH₂ wykazano możliwość produkcji RONS przez ten próbnik („self-fulfilling prophecy”) [1,2]. Przykłady generowania anionorodnika ponadtlenkowego przez próbnik DCFH₂ zostały przedstawione w rycinie 1. Reaktywnym indywiduum generującym RONS jest zarówno rodnik semichinonowy DCFH• jak i stan wzbudzony fluorescencyjnego produktu (DCF)*, o silnie utleniającym charakterze, a powstający podczas procesu pomiaru ilości produktu technikami fluorymetrycznymi. Pomimo szeregu prac wskazujących na ograniczenia w zastosowaniu DCFH₂, nadal próbnik ten cieszy się powodzeniem i artykuły zawierające dane uzyskane przy użyciu tego próbника można znaleźć nawet w takich czasopismach jak *Nature* czy *Science*. Stosowanie DCFH₂ do wykrywania RONS wynika nie tylko z braku wiedzy o chemii tego próbника, czy z niedocenienia skutków jego reaktywności chemicznej, ale również z ograniczonej liczby ogólnie dostępnych, alternatywnych metod pomiarów RONS w komórkach.



Rycina 1. Przykłady produkcji anionorodnika ponadtlennego i nadtlenu wodoru w reakcjach redoks próbnika DCFH₂.

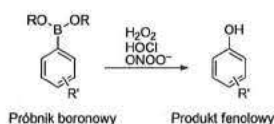
Drugim szeroko stosowanym próbnikiem *RONs* jest hydroetydyna (HE) jak również jej analog zawierający grupę trifenylofosfoniową, skierowującą ten próbnik wewnątrz komórki do mitochondriów (Mito-HE, znany jako MitoSOX[®] Red). Oba próbki stosowane są do fluorymetrycznego oznaczania wewnątrzkomórkowego (bądź wewnątrzmitochondrialnego) poziomu anionorodnika ponadtlenkowego. Poważnym, często nieuwzględnianym ograniczeniem w użyciu próbników opartych na hydroetydynie jest możliwość jej konwersji do dwóch różnych produktów fluorescencyjnych o zbliżonej charakterystyce spektralnej, lecz o innym mechanizmie powstawania: etydyna (E^+ , Mito- E^+) i 2-hydroksyetydyna (2-OH- E^+ , 2-OH-Mito- E^+), jak przedstawiono w rycinie 2. Powszechnie przyjmuje się, że 2-OH- E^+ jest produktem

specyficznym dla reakcji hydroetydyny z anionorodnikiem ponadtlenkowym, podczas gdy E^+ jest produktem niespecyficznym, niepowstającym w reakcji HE z $O_2^{\bullet-}$. Bez wiedzy o strukturze chemicznej powstającego indywiduum fluorescencyjnego, niemożliwe jest określenie czy wzrost intensywności fluorescencji wynika ze zwiększonego strumienia (bądź stężenia stacjonarnego) anionorodnika ponadtlenkowego, czy z utleniania HE to E^+ , niezależnego od $O_2^{\bullet-}$.



Rycina 2. Schemat utleniania HE (oraz Mito-HE) do E^+ i 2-OH- E^+ (oraz Mito- E^+ i 2-OH-Mito- E^+)

W ciągu ostatniej dekady opracowano nową klasę próbników, opartych na utlenianiu aromatycznych związków boronowych do odpowiednich produktów fenolowych, w celu selektywnego wykrywania nadtlenu w układach biologicznych [3]. Analiza reaktywności chemicznej kwasów i estrów boronowych wskazuje, że są one utleniane również przez inne formy RONS, w tym nadtlenoazotyn ($ONOO^-$), jak pokazano w rycinie 3. Pomimo braku pełnej selektywności próbki boronowe stanowią obiecującą klasę związków do wykrywania wybranych form RONS zarówno w układach komórkowych jak i pozakomórkowych.



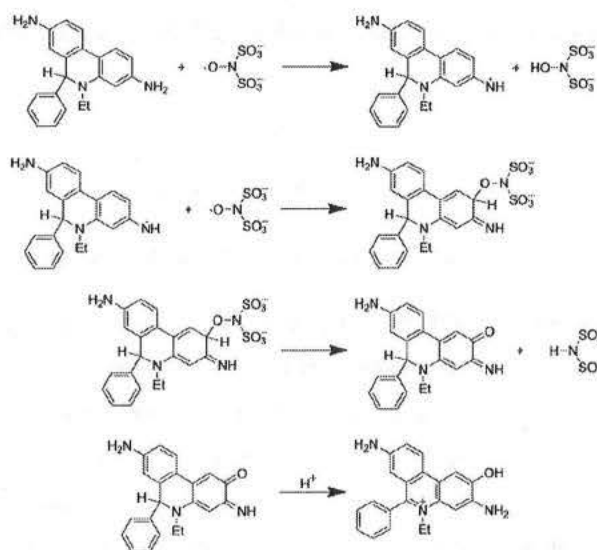
Rycina 3. Schemat utleniania aromatycznych próbników boronowych do odpowiednich fenoli

W serii prac stanowiących cykl habilitacyjny zbadana została reaktywność chemiczna hydroetydyny, w tym identyfikacja nowych produktów utleniania oraz opracowane metody selektywnej detekcji 2-OH- E^+ i oszacowania profilu produktów utleniania hydroetydyny w układach komórkowych. Na podstawie wyznaczonej chemicznej reaktywności wybranych próbników, zaproponowane zostały szybkie metody określania profilu różnych RONS produkowanych przez aktywowane makrofagi oraz opracowana metodyka testów przesiewowych o wysokiej przepustowości (*high throughput screening*, HTS) do poszukiwania nowych, selektywnych inhibitorów oksydazy NADPH.

W serii prac dotyczących chemicznej reaktywności hydroetydyny określiliśmy prawdopodobny mechanizm utleniania HE przez utleniacze jedno- i dwu-elektronowe,

scharakteryzowaliśmy nowe, dimerowe produkty jednoelektronowego utleniania HE oraz zaproponowaliśmy mechanizm reakcji z anionorodnikiem ponadtlenkowym, wyjaśniający powstawanie specyficznego produktu, 2-hydroksyetydyny.

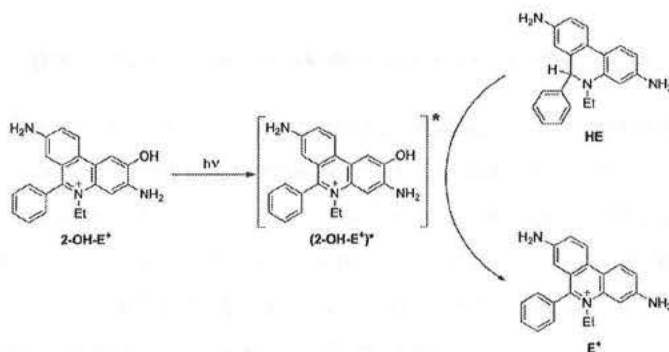
W pracy [H1] zaobserwowaliśmy, że sól Fremy'ego (*nitrosodisulfonate radical dianion, NDS*) reagując z hydroetydyną prowadzi do tego samego produktu, co anionorodnik ponadtlenkowy, 2-hydroksyetydyny. Umożliwiło to pierwsze badania nad mechanizmem utleniania hydroetydyny do 2-hydroksyetydyny przy użyciu względnie stabilnego utleniacza, soli Fremy'ego. Na podstawie wyznaczonej stechiometrii 2:1 (NDS:HE), kinetycznego efektu izotopowego $k_H/k_D = 1,9$, braku efektu odtlenienia roztworu na wydajność 2-OH-E⁺ oraz braku wbudowywania atomów tlenu z cząsteczek rozpuszczalnika (H₂¹⁸O), zaproponowaliśmy następujący model utleniania HE do 2-OH-E⁺ (rycina 4). W pierwszym etapie oderwanie atomu wodoru z aromatycznej grupy aminowej prowadzi do powstania rodnika aminylowego HE([•]NH) stabilizowanego przez rezonans z układem aromatycznym cząsteczki. W kolejnym etapie następuje addycja rodnika NDS bądź O₂^{•-} prowadząca do wbudowania atomu tlenu z utleniacza w szkielet próbника. W następnej reakcji eliminacji, powstaje iminochinonowa forma próbника, która po tautomeryzacji i uprotonowaniu prowadzi do powstania końcowego produktu, 2-hydroksyetydyny. Opublikowany artykuł nie tylko pozwolił zaproponować mechanizm reakcji hydroetydyny z O₂^{•-}, lecz również określił nową, nieenzymatyczną drogę syntezy 2-hydroksyetydyny, do zastosowania jako standard w pomiarach O₂^{•-} w komórkach i układach pozakomórkowych.



Rycina 4. Zaproponowany mechanizm reakcji hydroetydyny z solą Fremy'ego.

W kolejnej pracy nad reaktywnością hydroetydyny ([H2]) zbadaliśmy wpływ różnych czynników, jak światło, ultradźwięki i przeciwutleniacz Mn(III)TBAP na rozkład produktów utleniania HE. Określenie wpływu światła było istotne nie tylko ze względu na możliwe

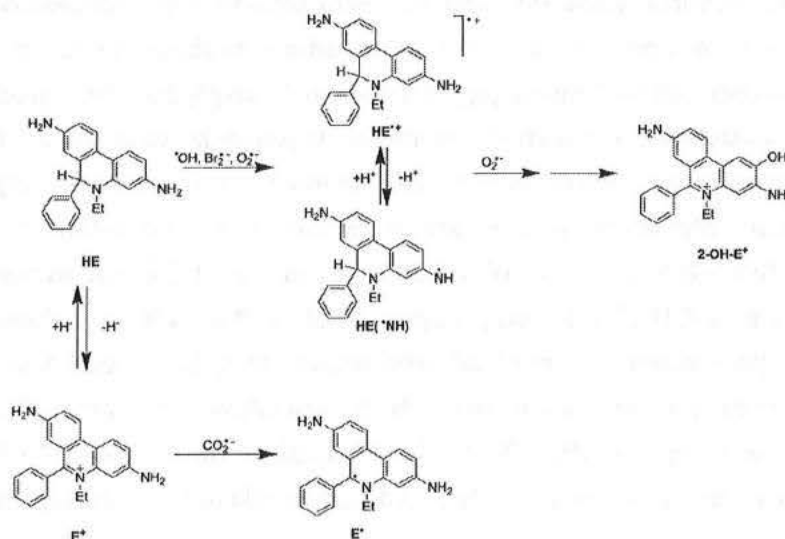
fotoutlenianie próbnika podczas inkubacji czy przygotowywania próbek do analizy HPLC, ale również ze względu na możliwość fotoreaktywności produktów utleniania podczas procesu detekcji produktów z użyciem technik fluorymetrycznych (np. mikroskopii fluorescencyjnej). Uzyskane wyniki wskazują na możliwość bezpośredniego fotoutleniania próbnika HE, jak również działania produktu 2-OH-E^+ jako fotouczałacz utleniania HE do niespecyficznego produktu, E^+ (rycina 5). Fotouczałające działanie 2-OH-E^+ pozwala przewidzieć zależność wydajności E^+ od strumienia $\text{O}_2^{\bullet-}$ w warunkach ekspozycji próbki na światło widzialne. W kontekście przygotowywania ekstraktów komórkowych do analizy HPLC zbadaliśmy również wpływ ultradźwięków na stabilność hydroetydyny w roztworach wodnych. Poddawanie zawiesiny komórek działaniu ultradźwięków jest częstą metodą lizy komórek, bez konieczności używania detergentów. Otrzymane wyniki wskazują na generowanie $\text{O}_2^{\bullet-}$ i jego produktu, 2-OH-E^+ , zgodnie ze znaną sonochemią roztworów wodnych. Na podstawie tych wyników wnioskowaliśmy, że w procesie przygotowywania próbek do analizy należy unikać sonolizy wodnych zawiesin komórek zawierających HE. Mn(III)TBAP jest stosowany jako katalityczny zmiatacz anionorodnika ponadtlenkowego w układach biologicznych. Ze względu na jego utleniające właściwości, sprawdziliśmy jego reaktywność względem HE i produktów utleniania, 2-OH-E^+ i E^+ . Na podstawie uzyskanych wyników wywnioskowaliśmy, że Mn(III)TBAP może bezpośrednio konsumować hydroetydynę, jak również, przy wyższych stężeniach produkty utleniania próbnika. Wyniki te jednoznacznie wskazują na konieczność unikania związku Mn(III)TBAP w badaniach z użyciem próbnika HE. W pracy [H2] opracowaliśmy również nową metodę detekcji HE, 2-OH-E^+ i E^+ przy użyciu HPLC z 8-kanalową kulometryczną detekcją elektrochemiczną, pozwalającą na rozdział produktów nie tylko na podstawie różnych czasów retencji, lecz również na podstawie różnych potencjałów utleniania. Potencjał utleniania związków wzrastał w kolejności $\text{HE} < 2\text{-OH-E}^+ < \text{E}^+$. Czułość opracowanej techniki przewyższała ponad 10-krotnie ówczesne metody oparte na HPLC z detekcją fluorymetryczną.



Rycina 5. Schemat fotoutleniania próbnika HE do E^+ katalizowanego przez 2-OH-E^+ .

W pracy [H3] skoncentrowaliśmy się na badaniach celem pogłębienia wiedzy o mechanizmie utleniania hydroetydyny do 2-hydroksyetydyny i etydyny. W tym celu wykorzystaliśmy rozdzielczą w czasie technikę radiolizy impulsowej jak również stacjonarne badania z użyciem

odczynnika Fentona. Jednym z głównych sukcesów w badaniach radiolitycznych było wykazanie, że w reakcji HE z anionorodnikiem ponadtlennym powstaje identyczne indywiduum przejściowe jak w reakcji z anionorodnikiem bromkowym $\text{Br}_2^{\cdot-}$, będącym selektywnym utleniaczem 1-elektronowym. Duże podobieństwo spektralne widma UV-vis powstającego indywiduum z widmem kationorodnika benzydyny sugeruje, że w pH 7,4 przeważającą formą jest kationorodnik HE^{*+} . Ponieważ jednoelektronowa redukcja kationu etydydy prowadzi do rodniaka o innym widmie w zakresie UV-vis, można wnioskować, że kationorodnik HE^{*+} powstający w procesie jednoelektronowego utleniania HE jest w równowadze kwasowo-zasadowej z aromatycznym rodniakiem aminylowym (rycina 6), sugerowanym w pracy [H1] jako produkt przejściowy w reakcji HE z NDS. Wyniki przedstawione w pracy [H3] wskazują, że specyficzność 2-hydroksyetydydy względem anionorodnika ponadtlennego wynika z reaktywności kationorodnika HE^{*+} względem $\text{O}_2^{\cdot-}$, zaś pierwszy etap utleniania jest wspólny dla szeregu jednoelektronowych utleniaczy.

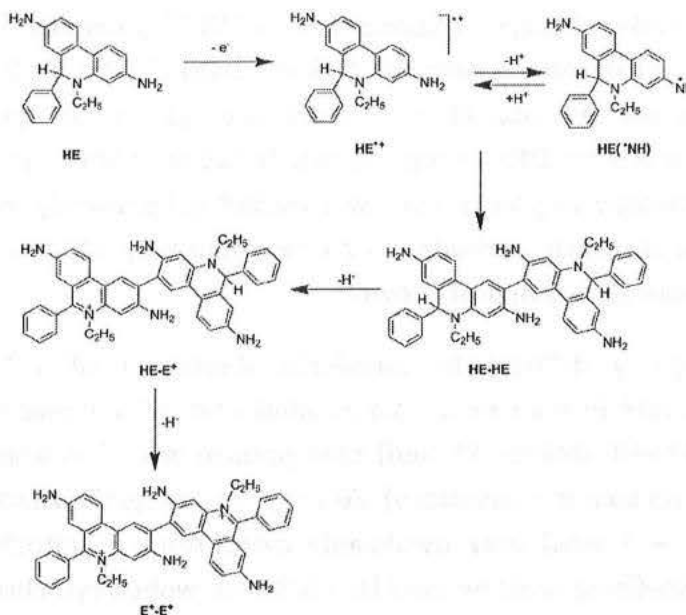


Rycina 6. Postulowane produkty pośrednie w reakcjach utleniania hydroetydydy i redukcji etydydy.

Kolejna praca [H4] powstała w odpowiedzi na zaproszenie przez edytora *Nature Protocols*, w związku z uznaniem metody pomiaru 2-hydroksyetydydy jako „złotego standardu” w detekcji anionorodnika ponadtlennego w komórkach i szerokim zainteresowaniem tą metodą. W pracy tej, obok szczegółowego protokołu pomiarów 2-OH-E^{·+} i 2-OH-Mito-E^{·+} w ekstraktach komórkowych, zamieściliśmy dyskusję możliwych czynników mogących mieć wpływ na mierzony poziom 2-OH-E^{·+}, w tym wewnątrzkomórkowe stężenie próbnika oraz obecność jednoelektronowych utleniaczy. Zamieściliśmy również charakterystykę spektroskopową (widma absorpcji UV-vis oraz fluorescencji) próbnika HE oraz dwóch produktów: 2-OH-E^{·+} i E^{·+}. Wykazaliśmy, że widmo absorpcji i intensywność fluorescencji roztworów 2-OH-E^{·+} zależy nie tylko od obecności DNA, lecz również od polarności rozpuszczalnika. Badania zależności

kwasowo-zasadowej widm absorpcji i fluorescencji 2-OH-E⁺ pozwoliły oszacować wartość pK_a grupy hydroksylowej w roztworach wodnych (7,3 dla 2-OH-E⁺ i 7,2 dla 2-OH-Mito-E⁺). Wartość ta jest wyraźnie niższa od opublikowanej wartości pK_a = 10 [4], zmierzonej jednak fluorymetrycznie w obecności DNA, i sugerującej, że kation 2-OH-E⁺ jest formą wiążącą się z DNA. Badania spektroskopowe przy różnych wartościach pH pozwoliły również wywnioskować, że dodatkowe pasmo absorpcji i wzbudzenia z maksimum przy 370 nm jest charakterystyczne dla formy uprotonowanej grupy hydroksylowej.

Celem kolejnej pracy ([H5]) było określenie stabilności HE i Mito-HE w obecności cytochromu c, w kontekście pomiarów anionorodnika ponadtlenkowego w mitochondriach z użyciem próbnika Mito-HE (MitoSOX® Red) oraz pomiarów O₂^{•-} w komórkach w warunkach programowanej śmierci komórki (apoptozy). Ze względu na wysoką zawartość cytochromu c w mitochondriach (0,1 – 5 mM) oraz uwalnianie cytochromu z mitochondriów do cytozolu podczas apoptozy, określenie reaktywności HE i Mito-HE wobec cytochromu c jest kluczowym warunkiem stosowania tych próbników. W pracy [H5] wykazaliśmy, że zarówno ferricytochrom c jak i anion żelazycyjanu są zdolne do utleniania hydroetydyny z utworzeniem zarówno kationu E⁺ (bądź Mito-E⁺) jak i dimeru HE-HE. Dimer ten w obecności utleniaczy ulega dalszym przekształceniom do HE-E⁺ i E⁺-E⁺, jak pokazano na rycinie 7. Dimer E⁺-E⁺ (dietydyna) zsyntetyzowaliśmy w wystarczającej ilości do wykonania szczegółowych analiz NMR i HRMS, celem określenia jego struktury. Uzyskane wyniki wskazują, że dimer E⁺-E⁺ jest symetryczny oraz, że wiązanie dimerowe zlokalizowane jest pomiędzy atomami węgla C₂ i C₂'. Analiza poziomu HE i Mito-HE w izolowanych frakcjach mitochondrialnych zawierających cytochrom c bądź pozbawionych cytochromu c (mitoplasty) jednoznacznie wskazuje na znaczną konsumpcję próbników w warunkach naturalnego stężenia cytochromu c. Chociaż zaobserwowana reaktywność HE, a szczególnie Mito-HE znacznie ogranicza ich zastosowania, scharakteryzowanie dodatkowych produktów utleniania HE i synteza standardu dietydyny E⁺-E⁺ pozwala przy użyciu pojedynczego próbnika śledzić nie tylko anionorodnik ponadtlenkowy, lecz również utleniacze jednoelektronowe, w tym rodniki powstające z rozpadu nadtlenuazotynu. W pracy tej, po raz pierwszy zaobserwowaliśmy również enzymatyczną aktywność oksydazy cytochromowej w reakcji utleniania HE do E⁺. Uzyskane wyniki wskazują, że wzrostu intensywności fluorescencji pochodzącej od HE bądź Mito-HE nie tylko nie można utożsamiać ze wzrostem produkcji O₂^{•-}, ale również ze wzrostem całkowitej puli RONS. Dodatkowym wnioskiem z pracy [H5] jest wysokie podobieństwo w reaktywności chemicznej w reakcjach utleniania pomiędzy próbnikami HE i Mito-HE. W pracy tej wykazaliśmy, że pozycja grupy hydroksylowej jest taka sama dla produktów reakcji O₂^{•-} z HE i Mito-HE, wbrew wcześniejszym sugestiom, że w przypadku Mito-HE hydroksylowanie następuje przy atomie węgla C-9 [4].



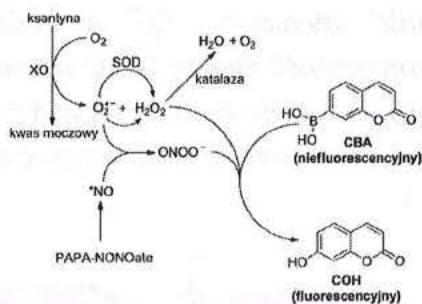
Rycina 7. Schemat jednoelektronowego utleniania próbника HE.

W związku z odkryciem dodatkowych, dimerowych produktów utleniania hydroetydyny, o potencjalnym zastosowaniu diagnostycznym względem jednoelektronowych utleniaczy ([H5]), zaistniała potrzeba pracy metodycznej, udostępniającej społeczności naukowej metodykę ekstrakcji i detekcji HE (i Mito-HE) wraz z pełną gamą produktów utleniania (2-OH-E^+ , E^+ , HE-HE, HE- E^+ , E^+-E^+ , oraz analogów z grupą trifenylofosfoniową). W kolejnej pracy ([H6]) przedstawiony został protokół ekstrakcji z komórek i analizy chromatograficznej HPLC próbника HE (oraz Mito-HE) i odpowiednich produktów wewnątrzkomórkowego utleniania. Opisaliśmy różne warianty syntezy i oczyszczania niedostępnych komercyjnie standardów produktów utleniania oraz metody chromatograficzne i parametry detekcji próbników i ich produktów z użyciem techniki HPLC z detekcją (a) spektrofotometryczną i fluorymetryczną, (b) elektrochemiczną, oraz (c) spektrometrii mas.

Praca [H7] jest artykułem przeglądowym mającym na celu ułatwienie potencjalnym użytkownikom próbników HE i Mito-HE zrozumienia reaktywności chemicznej próbników oraz ograniczeń związanych z fluorymetryczną analizą anionorodnika ponadtlenkowego przy użyciu HE bądź Mito-HE. W pracy tej opisaliśmy dane literaturowe dotyczące reaktywności próbników względem różnych biologicznie ważnych utleniaczy oraz przedstawiliśmy ewolucję zastosowania hydroetydyny od próbника na przeżywalność komórek poprzez selektywny próbnik fluorescencyjny do wykrywania $\text{O}_2^{\bullet-}$, do metod opartych na selektywnym oznaczaniu 2-hydroksyetydyny jako diagnostycznego produktu dla anionorodnika ponadtlenkowego. W pracy tej opisaliśmy również najważniejsze zastosowania próbника w badaniach biologicznych, zarówno oparte na pomiarach całkowitej fluorescencji jak i opartych na chromatograficznym rozdziale i selektywnej detekcji 2-OH-E^+ . Artykuł zawiera również analizę kinetyczną wpływu

wewnątrzkomórkowego poziomu próbnika na jego zdolność konkurencji o $O_2^{\bullet-}$ z dysmutazą ponadtlenkową oraz możliwości normalizacji oznaczonego poziomu 2-OH-E^+ do wewnątrzkomórkowego poziomu HE.

Kolejna praca cyklu habilitacyjnego ([H8]) powstała w oparciu o nasze wcześniejsze odkrycie wysokiej reaktywności kwasów i estrów boronowych względem nadtlendioazotynu ($ONOO^-$). W pracy tej użyliśmy kwasu boronowego opartego na strukturze kumaryny (*coumarin boronic acid*, CBA) jako profluorescencyjnego próbnika do detekcji nadtlendioazotynu. CBA jest pierwszym profluorescencyjnym próbnikiem do pomiarów $ONOO^-$ reagującym szybko ($k = 1,1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), bezpośrednio i stochiometrycznie (1:1) z nadtlendioazotynem. W pracy tej wykazaliśmy również, iż nadtlendioazotyn jest głównym indywiduum powstającym przy pH 7,4 w obecności strumienia $O_2^{\bullet-}$ oraz $^{\bullet}\text{NO}$, niezależnie od stosunku wartości strumieni obu reagentów (rycina 8). Poprzednie doniesienia literaturowe, z użyciem dihydrorodaminy jako próbnika na $ONOO^-$, wskazywały na zmienność wydajności $ONOO^-$ w zależności od względnych strumieni $O_2^{\bullet-}$ i $^{\bullet}\text{NO}$, o kształcie krzywej dzwonowej [5]. W obliczu danych eksperymentalnych uzyskanych z użyciem CBA jako bezpośredniego próbnika na $ONOO^-$, poprzednie doniesienia literaturowe można wytłumaczyć brakiem bezpośredniej reakcji pomiędzy dihydrorodaminą i nadtlendioazotynem i dodatkowymi reakcjami pomiędzy rodnikiem próbnika i substratem nadtlendioazotynu ($O_2^{\bullet-}$ bądź $^{\bullet}\text{NO}$) obecnym w nadmiarze.

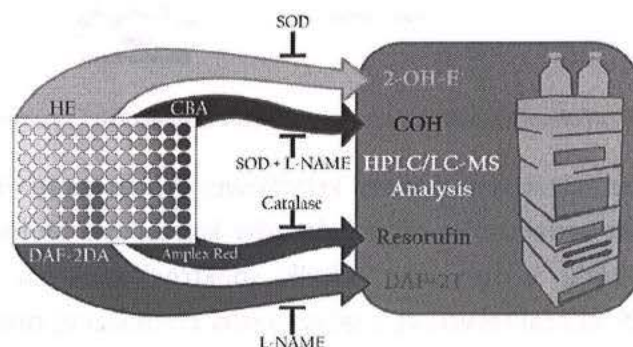


Rycina 8. Mechanizm utleniania próbnika CBA w obecności strumieni $O_2^{\bullet-}$ oraz $^{\bullet}\text{NO}$.

Pozycja [H9] jest rozdziałem w publikacji książkowej *Principles of Free Radical Biomedicine* przeznaczonej w zamyśle redaktorów dla studentów kierunków biomedycznych. W rozdziale tym przedstawiliśmy krótki wstęp do technik spektroskopowych używanych do badań rodnikowych form *RONS*, charakterystykę reaktywności chemicznej oraz metody generowania, detekcji i badania wybranych rodników o znaczeniu biologicznym. Rozdział ten zawiera również dyskusję reaktywności chemicznej i wynikające z niej ograniczenia stosowania popularnych spektroskopowych próbników na *RONS*.

W kolejnej pozycji cyklu habilitacyjnego ([H10]) zaproponowaliśmy połączenie użycia wybranych pro-fluorescencyjnych próbników do równoległej analizy i monitorowania różnych

form *RONs* w trybie o wysokiej przepustowości (*high throughput*) w układach biologicznych. Proponowane podejście polega na podzieleniu płytki wielostudzienkowej (96- lub 384-studzienkowej) na poszczególne sektory odpowiadające każdemu z próbników i monitorowanie zmian intensywności fluorescencji w czasie rzeczywistym z użyciem odpowiedniego czytnika płytek. W publikacji zaproponowaliśmy model linii komórkowej mysich makrofagów RAW 264.7 aktywowanych do produkcji $O_2^{\bullet-}$ i/lub $^{\bullet}NO$ i pomiar następujących form *RONs*: $O_2^{\bullet-}$ (z użyciem hydroetydyny), $^{\bullet}NO$ (z użyciem diaminofluoresceiny), H_2O_2 (z użyciem próbника Amplex Red w obecności peroksydazy chrzanowej) oraz $ONOO^-$ (z użyciem CBA oraz nowego próbника boronowego, FIAmBE). Nowy próbnik boronowy, FIAmBE, po utlenieniu tworzy produkt charakteryzujący się fluorescencją w zakresie światła zielonego (ok. 520 nm) i może być stosowany w sytuacjach gdy fluorescencja od produktu utleniania próbника CBA (7-hydroksykumaryna) w zakresie światła niebieskiego (ok. 450 nm) jest maskowana przez autofluorescencję komórek. Proponowane analizy z użyciem czytnika płytek połączone są z analizami chromatograficznymi HPLC próbników i ich produktów utleniania bądź nitrozowania. W artykule tym opisujemy nowe, krótkie (< 10 min) metody analizy produktów, pozwalające na analizę w relatywnie krótkim czasie płytki 96-studzienkowej (np. dla określenia pełnych profili utleniania HE, analiza 96 studzienek zajmuje 13 godzin). Analiza utleniania HE w obecności różnych strumieni $O_2^{\bullet-}$ i $^{\bullet}NO$ wskazuje na zmianę tożsamości produktu fluorescencyjnego z 2-OH-E⁺ do E⁺ w miarę zwiększania strumienia $^{\bullet}NO$ przy stałym strumieniu $O_2^{\bullet-}$. Wyniki te wskazują na zmianę tożsamości utleniacza z $O_2^{\bullet-}$ na rodniki powstałe w wyniku rozpadu nadtlenuazotynu, ilustrując konieczność analizy HPLC w celu poprawnej identyfikacji danych uzyskanych przy użyciu detekcji fluorymetrycznej. Przykład połączenia analizy fluorymetrycznej na płytkach wielostudzienkowych z analizą chromatograficzną próbników i ich produktów przedstawiony jest na rycinie 9.

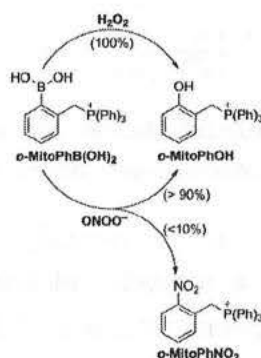


Rycina 9. Schemat układu eksperymentalnego do równoległego badania różnych form *RONs* generowanych w układach komórkowych bądź pozakomórkowych

Pozycja [H11] jest artykułem przeglądowym na temat reaktywności próbników boronowych względem różnych, biologicznie ważnych utleniaczy. W artykule tym podkreśliliśmy, że większość związków boronowych wykazuje bardzo podobną reaktywność względem utleniaczy,

przy czym przy jednakowych stężeniach reagują one ok. miliona razy szybciej z nadtlenoazotynem ($k \sim 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) niż z nadtlenkiem wodoru ($k \sim 1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Przeprowadzone symulacje kinetyczne wskazują, że w obecności stałego strumienia nadtlenoazotynu dynamika wzrostu produktu fenolowego niemal natychmiast ($< 1\text{min}$) zaczyna odzwierciedlać dynamikę produkcji ONOO^- nawet dla $20 \mu\text{M}$ stężenia związku boronowego. W tych samych warunkach i przy $0,5 \text{ mM}$ stężeniu próbnika potrzeba ponad 30 min, aby szybkość tworzenia produktu odzwierciedlała strumień H_2O_2 . W artykule tym wskazujemy, że mimo względnie wysokiej reaktywności związków boronowych z kwasem podchlorynowym (HOCl) w $\text{pH } 7,4$ ($k \sim 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), reakcja ta ma raczej niewielkie znaczenie w układach biologicznych ze względu na wysoką reaktywność HOCl względem endogennych związków zawierających grupy aminowe i tiolowe.

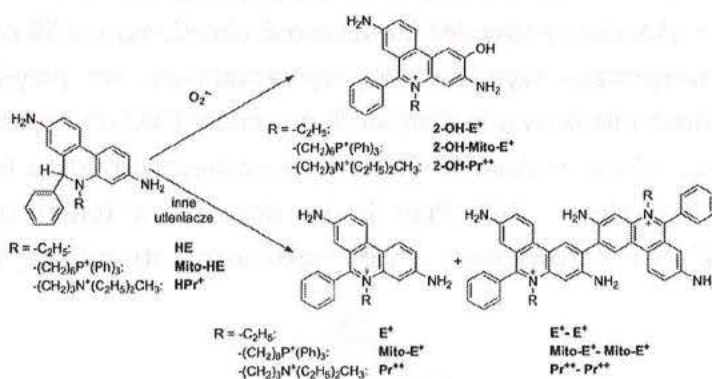
Pozycja [H12] jest artykułem metodycznym, opisującym chromatograficzne metody oznaczeń wybranych *RONS* z użyciem próbników tworzących specyficzne produkty dla określonej formy *RONS* na płytkach wielostudzienkowych podzielonych na odpowiednie sektory dla każdego próbnika. Połączenie detekcji specyficznych produktów z określeniem wpływu selektywnych zmiataaczy bądź inhibitorów ma umożliwić jednoznaczną charakterystykę mierzonego indywiduum. W pracy tej zaproponowaliśmy użycie próbnika *o*-MitoPhB(OH)₂, który w reakcji z nadtlenoazotynem, obok głównego produktu fenolowego *o*-MitoPhOH, daje dodatkowy, uboczny produkt nitrowania, charakterystyczny dla ONOO^- *o*-MitoPhNO₂ (rycina 10) [6]. W pracy tej wykazujemy również konieczność określenia profili różnych form *RONS* w celu prawidłowej interpretacji wyników eksperymentalnych. Na przykład, ze względu na oksydacyjny mechanizm nitrozowania diaminofluoresceiny (DAF-2) używanej do detekcji $\cdot\text{NO}$, obecność utleniaczy zwiększa wydajność charakterystycznego produktu triazolowego, DAF-2T, nawet przy stałym strumieniu $\cdot\text{NO}$. Przy braku danych na temat obecności utleniaczy, zwiększenie ilości DAF-2T zinterpretowane byłoby jako wzrost strumienia $\cdot\text{NO}$.



Rycina 10. Ścieżki utleniania próbnika *o*-MitoPhB(OH)₂ przez H_2O_2 oraz ONOO^- .

Pozycja [H13] jest artykułem przeglądowym, opisującym wartość metod chromatograficznych analizy produktów utleniania hydroetydyny i jej analogów, Mito-HE i hydropropydney (HPr^+ [7]), do wykrywania anionorodnika ponadtlenkowego i innych utleniaczy

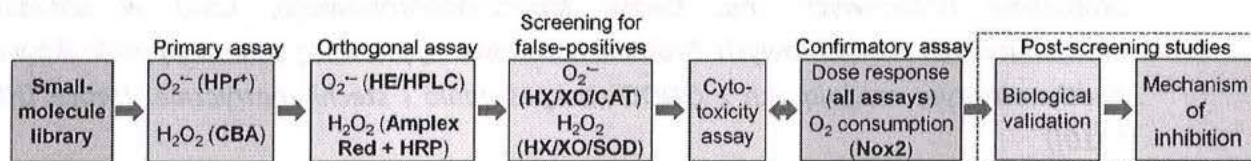
wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych (rycina 11). W artykule tym porównujemy widma fluorescencji 2-OH-Mito-E⁺ i Mito-E⁺ w formacie matrycy wzbudzenie/emisja (*fluorescence excitation/emission matrix, FEEM*) celem uwidocznienia problemu z rozdziałem pasm fluorescencji obu związków i koniecznością chromatograficznego rozdzielenia produktów utleniania hydroetydyny i jej analogów. W kontekście biologicznego znaczenia reaktywności chemicznej próbników pozycja [H13] zawiera warty odnotowania dodatkowy przykład analizy porównawczej utleniania hydroetydyny w różnych modelach komórkowych choroby Parkinsona (*Parkinson's Disease, PD*). Pokazujemy, że wbrew powszechnej opinii, produkcja anionorodnika ponadtlenkowego nie jest cechą wspólną różnych modeli komórkowych *PD*, i w przypadku np. rotenonu jednoelektronowe utlenienie, a w przypadku 6-hydroksydopaminy dwuelektronowe utlenienie hydroetydyny jest mechanizmem prowadzącym do zwiększonej fluorescencji obserwowanej dla tych związków. Jak wykazaliśmy w oryginalnej pracy, inhibicja oksydacji fosforylacyjnej i obniżenie poziomu ATP jest cechą wspólną tych modeli, a nie wzrost poziomu O₂^{•-} [8]. W artykule [H13] proponujemy również nowe podejście eksperymentalne polegające na użyciu trzech próbników, HE, Mito-HE i HPr⁺, do badania poziomu O₂^{•-} i innych utleniaczy odpowiednio jako całkowita pula w komórkach, w przestrzeni mitochondrialnej oraz w przestrzeni na zewnątrz komórek.



Rycina 11. Schemat utleniania próbników HE, Mito-HE i HPr⁺ w reakcjach zależnych oraz niezależnych od anionorodnika ponadtlenkowego (O₂^{•-}).

W pozycji [H14] proponujemy nową metodę badań przesiewowych o wysokiej przepustowości (*HTS*) w celu odkrycia nowych, selektywnych inhibitorów oksydazy NADPH (*NADPH oxidase, Nox*). Pomimo przyjmowanego udziału izoenzymów *Nox* w patofizjologii układu naczyniowego, procesach neurodegeneracyjnych czy chorobach nowotworowych, nie ma obecnie powszechnie dostępnych inhibitorów nie tylko specyficznych względem określonego izoenzymu *Nox*, lecz nawet specyficznych względem całej rodziny enzymów *Nox*. Schemat proponowanych badań przesiewowych przedstawiony jest na rycinie 12. Podstawowe elementy nowości naukowej tego artykułu to: (i) zastosowanie w analizach podstawowych

nowych próbników fluorescencyjnych o scharakteryzowanej reaktywności chemicznej i ściśle określonej reaktywności względem $O_2^{\bullet-}$ (hydropropydylna, HPr⁺) i H_2O_2 (CBA); (ii) opracowanie bardzo szybkiej (90 s) metody chromatograficznej do analizy 2-OH-E⁺ na płytce 384-studzienkowej; (iii) opracowanie metody analizy aktywności mitochondriów (oddychanie komórkowe) i aktywności Nox2 w modelu zdyferencjonowanych komórek HL60, w formacie płytki 96-studzienkowej z użyciem analizatora strumieni zewnątrzkomórkowych Seahorse XF96, bez próbników RONS do testów potwierdzających; (iv) opracowanie metody jednoczesnej detekcji $O_2^{\bullet-}$ i H_2O_2 z użyciem mieszaniny próbników HE i CBA, z bardzo szybką detekcją chromatograficzną (90 s) produktów COH i 2-OH-E⁺; (v) analiza porównawcza produkcji $O_2^{\bullet-}$ i H_2O_2 przez trzy izoenzymy: Nox2, Nox4 i Nox5. W artykule tym pokazujemy przykład badań przesiewowych niewielkiej grupy związków (~40 związków) w formacie płytek 384-studzienkowych, i proponujemy nowy związek jako inhibitor enzymu Nox2. Wykazujemy, że komercyjne inhibitory oksydazy NADPH, DPI i VAS2870, w przeciwieństwie do nowoodkrytego inhibitora, oprócz inhibicji enzymu Nox2 prowadzą do inhibicji oddychania komórkowego (mitochondrialnej konsumpcji tlenu). Dodatkowo, wykazujemy w tym artykule, że izoenzym Nox4, w przeciwieństwie do Nox2 i Nox5, produkuje H_2O_2 jako jedyny mierzalny produkt, bez uwalniania $O_2^{\bullet-}$, wbrew wielu raportom literaturowym, wskazującym na podwyższoną produkcję $O_2^{\bullet-}$ w układach biologicznych zawierających Nox4 na podstawie zwiększonej intensywności fluorescencji pochodzącej od utleniania hydroetydyny.



Rycina 12. Schemat badań przesiewowych o wysokiej przepustowości w celu odkrycia nowych, selektywnych inhibitorów oksydazy NADPH.

Podsumowanie najważniejszych osiągnięć naukowych habilitanta, opisanych w cyklu habilitacyjnym:

1. Zaproponowałem mechanizm utleniania próbniaka hydroetydyny (HE) i mito-hydroetydyny (Mito-HE, MitoSOX Red) w reakcjach w obecności anionorodnika ponadtlennkowego oraz w reakcjach utleniania jedno- i dwuelektronowego w nieobecności anionorodnika ponadtlennkowego. Dokonałem charakterystyki spektroskopowej i kinetycznej kationorodnika HE^{•+}. Określiłem źródło specyficzności produktu 2-OH-E⁺ dla reakcji HE z anionorodnikiem ponadtlennkowym. (prace [H1], [H3], [H5]).

2. *Opisałem fotochemiczne reakcje utleniania hydroetydyny. Odkryłem fotouczulający wpływ produktu utleniania próbnika, 2-OH-E⁺, w konwersji hydroetydyny do kationu etydyny (E⁺). Określiłem inne czynniki (sonoliza roztworów wodnych, reaktywność próbnika względem zmiataczy reaktywnych form tlenu i azotu) wpływające na stabilność próbnika. (praca [H2])*
3. *Odkryłem i określiłem struktury nowych, dimerowych produktów jednoelektronowego utleniania próbników HE i Mito-HE. Wykazałem występowanie jednoelektronowego utleniania próbników HE i Mito-HE w komórkach i izolowanych mitochondriach oraz wpływ poziomu cytochromu c na szybkość konsumpcji próbników. Wykazałem wysokie podobieństwo w reaktywności chemicznej próbników HE i Mito-HE. (praca [H5])*
4. *Dokonałem charakterystyki spektroskopowej (spektroskopia absorpcyjna UV-vis oraz spektrofluorymetria) próbników HE i Mito-HE oraz ich produktów utleniania. (prace [H4], [H5], [H6], [H7])*
5. *Opracowałem metody chromatograficzne HPLC (z detekcją absorpcyjną, fluorymetryczną, elektrochemiczną oraz spektrometrii mas) analizy produktów utleniania próbników opartych na hydroetydynie i próbników boronowych. Opracowałem protokoły pomiarowe detekcji anionorodnika ponadtlenkowego w układach chemicznych i biologicznych. (prace [H2], [H4], [H6], [H10], [H14])*
6. *Opracowałem metody detekcji nadtlenoazotynu z użyciem profluorescencyjnych próbników boronowych (np. kwasu kumarynoboronowego, CBA) w układach biochemicznych i komórkowych. Próbniki boronowe są pierwszą generacją próbników na nadtlenoazotyn, reagujących z ONOO⁻ bezpośrednio i stechiometrycznie. (prace [H8], [H10])*
7. *Opracowałem szybkie metody detekcji różnych reaktywnych form tlenu i azotu (RONS) z użyciem czynnika płytek w połączeniu z szybkimi analizami chromatograficznymi HPLC, celem określenia profili RONS produkowanych przez aktywowane makrofagi. Opracowałem szybkie metody chromatograficzne HPLC analizy specyficznych produktów powstających z próbników z określonymi formami RONS. (prace [H10], [H12])*
8. *Opracowałem nowe metody badań przesiewowych celem odkrycia nowych, selektywnych inhibitorów enzymów z rodziny oksydaz NADPH. (praca [H14])*
9. *Opracowałem nowe, szybkie metody chromatograficzne analizy produktów utleniania HE i CBA, (2-hydroksyetydyny i 7-hydroksykumaryny) oraz metody równoczesnej analizy obu produktów. Wykorzystałem te metody do równoczesnej detekcji anionorodnika ponadtlenkowego i nadtlenu wodoru i zastosowałem je do badań nad tożsamością pierwotnych produktów izoenzymów oksydazy NADPH: Nox2, Nox4 i Nox5. (praca [H14])*

Cytowana literatura z pominięciem prac wylistowanych jako dotychczasowy dorobek naukowy habilitanta:

- [1] Bonini M.G., et al. The oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein to reactive oxygen species: a self-fulfilling prophesy? *Free Radic. Biol. Med.* **2006**, *40*, 968-75.
- [2] Wrona M., Wardman P. Properties of the radical intermediate obtained on oxidation of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein, a probe for oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **2006**, *41*, 657-667.
- [3] Lippert A.R., et al. Boronate oxidation as a bioorthogonal reaction approach for studying the chemistry of hydrogen peroxide in living systems. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 793-804.
- [4] Robinson, K. M., et al. Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 15038–15043.
- [5] Thomas, D. D., et al. Superoxide Fluxes Limit Nitric Oxide-induced Signaling. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 25984-25993.
- [6] Sikora, A., et al. Reaction between peroxynitrite and triphenylphosphonium-substituted arylboronic acid isomers: identification of diagnostic marker products and biological implications. *Chem. Res. Toxicol.* **2013**, *26*, 856-867.
- [7] R. Michalski, et al. Hydropropidine: A novel, cell-impermeant fluorogenic probe for detecting extracellular superoxide. *Free Radic. Biol. Med.* **2013**, *54*, 135-147.
- [8] B. P. Dranka, et al. Alterations in bioenergetic function induced by Parkinson's disease mimetic compounds: Lack of correlation with superoxide generation. *J. Neurochem.* **2012**, *122*, 941-951.

5. Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze

5.1 Publikacje naukowe w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports

Przed uzyskaniem stopnia doktora (2 prace):

Prace [A1] i [A2] stanowią część mojej rozprawy doktorskiej. Praca [A1] przedstawia mechanizm wieloetapowego utleniania 3,6-diamino-10-metyloakrydanu. W pracy tej

scharakteryzowaliśmy spektroskopowo produkty pośrednie, kationorodnik oraz rodnik, łącząc badania w szklówkach kriogenicznych oraz rozdzielcze w czasie badania metodą radiolizy impulsowej i laserowej fotolizy błyskowej. Praca [A2] jest jedną z dwóch prac opublikowanych w tym samym czasie opisującą po raz pierwszy podstawową chemię radiacyjną niskotemperaturowych cieczy jonowych. Dodatkowo zaproponowaliśmy (wraz z przykładami) wykorzystanie cieczy jonowych w badaniach rodników i jonorodników związków słaborozpuszczalnych w klasycznych rozpuszczalnikach stosowanych w badaniach radiacyjnych szkliw niskotemperaturowych.

[A1] A. Marcinek, J. Zielonka, J. Adamus, J. Gębicki, M.S. Platz. Direct characterization of radical species generated on one-electron oxidation of 3,6-diamino-10-methylacridan. *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 875-879. IF₂₀₀₁ = **2,630**, wkład własny = **10%**, liczba cytowań: **7**

Moim wkładem jest wykonanie części pomiarów, analiza uzyskanych wyników oraz udział w przygotowaniu manuskryptu.

[A2] A. Marcinek, J. Zielonka, J. Gębicki, C.M. Gordon, I.R. Dunkin. Ionic Liquids: Novel Media for Characterization of Radical Ions. *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 9305-9309. IF₂₀₀₁ = **2,630**, wkład własny = **50%**, liczba cytowań: **79**

Moim wkładem jest zaprojektowanie i wykonanie większości pomiarów, analiza i dyskusja wyników oraz udział w przygotowaniu manuskryptu.

Po uzyskaniu stopnia doktora (artykuły niewchodzące do monotematycznego cyklu habilitacyjnego, 46 prac):

Po uzyskaniu stopnia doktora kontynuowałem badania nad reaktywnością rodników i jonorodników zarówno w kontekście badań podstawowych o znaczeniu poznawczym jak i badań stosowanych czy też o potencjalnym znaczeniu biologicznym/farmakologicznym. Wraz z moim wyjazdem na staż podoktorski do *Medical College of Wisconsin* zwiększyło się moje zainteresowanie badaniami o znaczeniu biologicznym i terapeutycznym oraz udziałem reaktywnych form tlenu i azotu w procesach fizjologicznych i patofizjologicznych. W tym czasie zauważyłem jak ważne w tych badaniach są metody detekcji oraz poznałem ograniczenia ówczesnie stosowanych technik. Doprowadziło to do mojej koncentracji na metodyce detekcji reaktywnych form tlenu i azotu w układach biologicznych oraz na poszukiwaniu nowych rozwiązań w tej dziedzinie. W ostatnich latach moje zainteresowania naukowe koncentrują się także profilowaniu metabolizmu komórkowego m.in. z wykorzystaniem technik chromatograficznych, w tym LC-MS/MS oraz na wykorzystaniu różnic w statusie

bioenergetycznym komórek rakowych (m. in. efekt Warburga) do selektywnej inhibicji wzrostu komórek rakowych *in vitro* oraz wzrostu tkanki nowotworowej *in vivo*.

Praca [B1] stanowi przykład badań podstawowych nad strukturą wysoce niestabilnych jonorodników. W pracy tej określiliśmy strukturę kationorodnika benzopinakolu, wykorzystując metodę radiolizy niskotemperaturowych szklów organicznych oraz napromieniania niskotemperaturowych matryc argonowych.

W serii prac ([B2], [B8], [B10]) wykonanych w ramach współpracy z Prof. J. Sokołowską (Katedra Barwników Politechniki Łódzkiej) określiliśmy reaktywność rodnikowych produktów pośrednich powstających w wyniku jednoelektronowego utleniania i redukcji barwników diazowych, w kontekście ich fotostabilności jak również możliwości degradacji w ściekach.

W związku z odkryciem potencjału terapeutycznego kationu 1-metylonikotynamidu (MNA^+), opublikowaliśmy pracę opisującą przeciwzapalne właściwości MNA^+ [B3], wskazującą po raz pierwszy, że MNA^+ jest biologicznie aktywnym metabolitem nikotynamidu. W kolejnej publikacji opisaliśmy reaktywność w reakcjach redoks nikotynamidu i jego metabolitów [B16]. W ramach tej tematyki opublikowaliśmy również artykuł opisujący drogę od badań podstawowych do odkrycia terapeutycznej funkcji MNA^+ [B5].

W związku z badaniami funkcji MNA^+ w komórkach badaliśmy również reakcje transhydrogenacji z udziałem kationów pirydyniowych, oraz możliwość modyfikacji wewnątrzkomórkowego stężenia koenzymu NADH w reakcjach enzymatycznych i nieenzymatycznych z udziałem kationów pirydyniowych ([B4], [B12]).

Udział i charakterystyka spektroskopowa produktów pośrednich w etapowym utlenianiu NADH do NAD^+ był przedmiotem badań artykułu [B7], powstałego na podstawie wyników opisanych w rozprawie doktorskiej. Mechanizmy wieloetapowych reakcji redoks w układzie $NAD(P)H:NAD(P)^+$ zostały opisane w pracy przeglądowej [B9].

W ramach współpracy z innymi grupami badawczymi, przeprowadziliśmy również kinetyczne badania reaktywności względem różnych reaktywnych form tlenu związków o znaczeniu terapeutycznym, w tym genisteiny [B6], oraz blokerów receptorów β -adrenergicznych [B13]. Charakterystyka produktów pośrednich w reakcjach redoks leku przeciwłuszczykowego, ditranolu, stanowiła temat kolejnej publikacji [B14].

Powiązane z tematyką cyklu habilitacyjnego są prace nad wykorzystaniem próbników boronowych do detekcji nadtlenoazotynu ([B24], [B27], [B33], [B46]) i wodoronadtlenków aminokwasów ([B43]) jak również badania i komentarze nad metodyką detekcji *RONs* i reaktywnością próbników, w tym DCFH ([B19]), hydropropydy ([B32]), chemiluminescencyjnego próbniaka L-012 ([B37]), hydroetydy ([B38], [B39]) czy pułapek

spinowych ([B39], [B42]). Opracowana w cyklu habilitacyjnym i wymienionych powyżej pracach metodyka badań reaktywnych form tlenu i azotu została wykorzystana w badaniach biologicznych procesów fizjologicznych oraz różnych modeli chorobowych, w tym w udziale anionorodnika nadtlenu w mechanizmie przeciwnowotworowego działania sangwinaryny ([B11]), udziale tlenu azotu w ścieżce sygnałowej nadtlenu wodoru w komórkach śródbłonna ([B15]), udziale $O_2^{\bullet-}$ w odpowiedzi komórkowej na kwas 20-hydroksyeikozatetraenowy (20-HETE, [B17]), produkcji RONS w komórkach mięśnia sercowego w odpowiedzi na działanie cytokin i lipopolisacharydu ([B18]), udziale $O_2^{\bullet-}$ w mechanizmie powstawania stanu zapalnego w tętnicach w zależności od szybkości przepływu krwi ([B20]), udziale $O_2^{\bullet-}$ w odpowiedzi komórkowej na anestetyk izofluran ([B23]), oraz na mitochinon (MitoQ, [B25]), zmian wewnątrzkomórkowego stężenia glutationu (GSH i GSSG) w odpowiedzi na lek przeciwnowotworowy, triapinę ([B26]), roli $O_2^{\bullet-}$ w modelach farmakologicznych komórkowych PD ([B31]), roli nadtlenu azotu w modelu *in vivo* PD ([B40]), oraz udziale różnych form RONS w immunoterapii nowotworów układu moczowego z użyciem szczepów BCG ([B44]).

Zainteresowanie udziałem RONS w patologii choroby Parkinsona ([B31]) i terapeutyczną efektywnością *in vivo* apocyniny, związku wykorzystywanego jako naturalny (pro)inhibitor oksydazy NADPH, zaowocowało artykułami wykazującymi wyższą efektywność pochodnych apocyniny, diapocyniny ([B34]) oraz mito-apocyniny ([B45]) w genetycznym modelu mysim choroby Parkinsona.

W artykule [B21] opisaliśmy wpływ bezpośredniego sąsiedztwa aminokwasów tyrozyny i metioniny oraz wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia elektronu w wybranych peptydach na produkty końcowe jednoelektronowego utleniania obu aminokwasów. Wyniki te pozwalają lepiej zrozumieć mechanizmy posttranslacyjnych modyfikacji białek w kontekście stresu oksydacyjnego.

W ostatnich latach pojawiły się raporty literaturowe wskazujące, że terapeutyki zaprojektowane celem akumulacji w mitochondriach (*mitochondria-targeted agents*, MTA) do usuwania RONS w modelach chorobowych układu naczyniowego i nerwowego (np. Mito-Q, Mito-CP), są również skuteczne w inhibicji proliferacji komórek nowotworowych. Doprowadziło to do hipotezy o udziale mitochondrialnych form RONS (w szczególności $O_2^{\bullet-}$ i H_2O_2) w mechanizmie wzrostu komórek rakowych. W naszych badaniach wykazaliśmy, że związki MTA (Mito-Q, Mito-CP, Mito-tokoferol, itd.) inhibują selektywnie wzrost komórek rakowych *in vitro* i prowadzą do obniżenia szybkości wzrostu tkanki nowotworowej w modelach mysich *in vivo* ([B28], [B30], [B35], [B36]). Dodatkowo, pokazaliśmy, że w normalnych tkankach te same związki działają ochronnie obniżając toksyczność klasycznych chemoterapeutyków (adriamycyna, cis-platyna) w modelach *in vivo* ([B22], [B29], [B36]). Różnice w reaktywności

chemicznej różnych związków z grupy MTA przy bardzo podobnym efekcie inhibitoryjnym względem oksydacji fosforylacyjnej i obniżeniu wewnątrzkomórkowego stężenia ATP, doprowadziły nas do wniosku, że związki te działają poprzez inhibicję oddychania komórkowego, a nie poprzez usuwanie mitochondrialnych RONS ([B30], [B35]). Wykorzystanie różnic w profilu bioenergetycznym komórek normalnych i nowotworowych stanowi obecnie jedną z głównych strategii w poszukiwaniu nowych, selektywnych chemoterapeutyków. W ostatniej pracy nad komórkami raka trzustki pokazaliśmy jak określenie profilu bioenergetycznego komórek nowotworowych pozwala przewidzieć efektywność potencjalnych leków antyglukolitycznych, oraz opracować strategię łączenia klasycznych chemoterapeutyków z nowymi, niskotoksycznymi inhibitorami metabolizmu, celem obniżenia stężenia chemoterapeutyków przy zachowaniu ich obecnej efektywności ([B41]).

[B1] J. Rogowski, J. Zielonka, A. Marcinek, J. Gębicki, P. Bednarek. Benzopinacol Radical Cation. *J. Phys. Chem. A* **2003**, 107, 810-814. IF₂₀₀₃ = 2,792, wkład własny = 10%, liczba cytowań: 5

Moim wkładem jest wykonanie i analiza części pomiarów.

[B2] R. Podsiadły, J. Sokołowska, A. Marcinek, J. Zielonka, E. Chreścijańska, A. Socha. Electrochemical and photochemical reduction of a series of azobenzene dyes in protic and aprotic solvents. *Color. Technol.* **2003**, 119, 269-274. IF₂₀₀₃ = 0,550, wkład własny = 15%, liczba cytowań: 7

Moim wkładem jest zaprojektowanie i współwykonanie części pomiarów, analiza i dyskusja wyników oraz udział w przygotowaniu manuskryptu.

[B3] J. Gębicki, A. Sysa-Jędrzejowska, J. Adamus, A. Woźniacka, M. Rybak, J. Zielonka. 1-Methylnicotinamide: A Potent Anti-inflammatory Agent. *Pol. J. Pharmacol.* **2003**, 55, 109-112. IF₂₀₀₃ = 0,829, wkład własny = 15%, liczba cytowań: 42

Moim wkładem jest zaprojektowanie i współwykonanie części pomiarów, analiza i dyskusja wyników oraz udział w przygotowaniu manuskryptu.

[B4] M. Wieczorkowska, J. Zielonka, E. Ciesielska, A. Marcinek, J. Celińska, J. Adamus, L. Szmigiero, J. Gębicki. 1-Methyl-3-nitropyridine: An Efficient Oxidant of NADH in Non-enzymatic and Enzyme-mediated Processes. *Free Rad. Res.* **2003**, 37, 1157-1162. IF₂₀₀₃ = 2,743, wkład własny = 15%, liczba cytowań: 6

Moim wkładem jest zaprojektowanie i współwykonanie części pomiarów, analiza i dyskusja wyników oraz udział w przygotowaniu manuskryptu.

[B5] J. Gębicki, J. Adamus, A. Marcinek, J. Zielonka, A. Sysa-Jędrzejowska, A. Woźniacka, A. Denys, I. Ciebiada, L. Szmigiero, E. Ciesielska, M. Wieczorkowska. In search for new drugs: from basic research to market product. *Przem. Chem.* **2003**, 82, 507-510. IF₂₀₀₃ = **0,296**, wkład własny = **10%**, liczba cytowań: **0**

Moim wkładem jest udział w przygotowaniu manuskryptu.

[B6] J. Zielonka, J. Gębicki, G. Gryniewicz. Radical scavenging properties of genistein. *Free Rad. Biol. Med.* **2003**, 35, 958-965. IF₂₀₀₃ = **5,063**, wkład własny = **70%**, liczba cytowań: **71**

Moim wkładem jest zaprojektowanie i wykonanie całości pomiarów i obliczeń, analiza i dyskusja wyników oraz przygotowanie wstępnej wersji manuskryptu.

[B7] J. Zielonka, A. Marcinek, J. Adamus, J. Gębicki. Direct Observation of NADH Radical Cation Generated in Reactions with One-electron Oxidants. *J. Phys. Chem. A* **2003**, 107, 9860-9864. IF₂₀₀₃ = **2,792**, wkład własny = **70%**, liczba cytowań: **14**

Moim wkładem jest zaprojektowanie i wykonanie całości pomiarów, analiza i dyskusja wyników oraz udział w przygotowaniu manuskryptu.

[B8] J. Zielonka, R. Podsiadły, M. Czerwińska, A. Sikora, J. Sokołowska, A. Marcinek. Color changes accompanying one-electron reduction and oxidation of the azo dyes. *J. Photochem. Photobiol A: Chem.* **2004**, 163, 373-379. IF₂₀₀₄ = **2,235**, wkład własny = **30%**, liczba cytowań: **8**

Moim wkładem jest zaprojektowanie i współwykonanie części pomiarów, analiza i dyskusja wyników oraz udział w przygotowaniu manuskryptu.

[B9] J. Gębicki, A. Marcinek, J. Zielonka. Transient species in the stepwise interconversion of NADH and NAD⁺. *Acc. Chem. Res.* **2004**, 37, 379-386. IF₂₀₀₄ = **13,154**, wkład własny = **25%**, liczba cytowań: **75**

Moim wkładem jest udział w przygotowaniu manuskryptu.

[B10] R. Podsiadły, J. Sokołowska, A. Marcinek, J. Zielonka, A. Socha, M. Kaźmierska. The relationship between the electrochemical and photochemical reduction of some azo dyes derived from 2-aminobenzothiazole. *J. Photochem. Photobiol A: Chem.* **2005**, 171, 69-76. IF₂₀₀₅ = **2,286**, wkład własny = **15%**, liczba cytowań: **5**

Moim wkładem jest zaprojektowanie i współwykonanie części pomiarów, analiza i dyskusja wyników oraz udział w przygotowaniu manuskryptu.

[B11] J. Huh, A. Liepins, J. Zielonka, C. Andrekopoulos, B. Kalyanaraman, A. Sorokin. Cyclooxygenase 2 rescues LNCaP prostate cancer cells from sanguinarine-induced apoptosis by

a mechanism involving inhibition of nitric oxide synthase activity. *Cancer Res.* **2006**, 66, 3726-3736. IF₂₀₀₆ = **7,656**, wkład własny = **15%**, liczba cytowań: **25**

Moim wkładem jest wykonanie części pomiarów dotyczących analizy poziomu anionorodnika ponadtlenkowego, analiza i dyskusja wyników oraz udział w przygotowaniu manuskryptu.

[B12] J. Zielonka, M. Rybak, J. Celińska, J. Adamus, A. Marcinek, J. Gębicki. Effect of heparin on viologen-stimulated enzymatic NADH depletion. *Chem. Res. Toxicol.* **2006**, 19, 668-673. IF₂₀₀₆ = **3,162**, wkład własny = **30%**, liczba cytowań: **5**

Moim wkładem jest zaprojektowanie i współwykonanie części pomiarów, analiza i dyskusja wyników oraz udział w przygotowaniu manuskryptu.

[B13] P. Szajerski, J. Zielonka, A. Sikora, J. Adamus, A. Marcinek, J. Gębicki, V. Kozlovski, Ł. Drelicharz, S. Chlopicki. Radical scavenging and NO-releasing properties of selected beta-adrenoreceptor antagonists. *Free Rad. Res.* **2006**, 40, 741-752. IF₂₀₀₆ = **2,536**, wkład własny = **15%**, liczba cytowań: **5**

Moim wkładem jest zaprojektowanie i współwykonanie części pomiarów oraz udział w przygotowaniu manuskryptu.

[B14] M. Czerwińska, A. Sikora, P. Szajerski, J. Zielonka, J. Adamus, A. Marcinek, K. Piech, P. Bednarek, T. Bally. Anthralin: Primary Products of Its Redox Reactions. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 5312-5319. IF₂₀₀₆ = **3,790**, wkład własny = **10%**, liczba cytowań: **8**

Moim wkładem jest współwykonanie części pomiarów, analiza i dyskusja wyników.

[B15] S. Thomas, S. Kotamraju, J. Zielonka, D. R. Harder, B. Kalyanaraman. Hydrogen Peroxide Induces Nitric Oxide and Proteasome Activity in Endothelial Cells: A Bell-Shaped Signaling Response. *Free Radic. Biol. Med.* **2007**, 42, 1049-1061. IF₂₀₀₇ = **5,512**, wkład własny = **20%**, liczba cytowań: **43**

Moim wkładem jest zaprojektowanie i współwykonanie części pomiarów, analiza i dyskusja wyników oraz udział w przygotowaniu manuskryptu.

[B16] A. Sikora, P. Szajerski, Ł. Piotrowski, J. Zielonka, A. Adamus, A. Marcinek, J. Gębicki. Radical scavenging properties of nicotinamide and its metabolites. *Radiat. Phys. Chem.* **2008**, 77, 259-266. IF₂₀₀₈ = **0,882**, wkład własny = **10%**, liczba cytowań: **6**

Moim wkładem jest zaprojektowanie i współwykonanie części pomiarów, analiza i dyskusja wyników.

[B17] M. M. Medhora, Y. Chen, S. K. Gruenloh, D. Harland, S. Bodiga, J. Zielonka, D. Gebremedhin, Y. Gao, J. R. Falck, S. Anjaiah, E. R. Jacobs. 20-HETE increases superoxide production and activates NADPH oxidase in pulmonary artery endothelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2008**, 294, L902-L911. IF₂₀₀₈ = 3,924, wkład własny = 10%, liczba cytowań: 29

Moim wkładem jest wykonanie części pomiarów dotyczących analizy poziomu anionorodnika nadadtlenkowego, analiza i dyskusja wyników oraz udział w przygotowaniu manuskryptu.

[B18] J. Vasquez-Vivar, J. Whitsett, I. Ionova, E. Konorev, J. Zielonka, B. Kalyanaraman, Y. Shi, G. M. Pieper. Cytokines and lipopolysaccharides induce inducible nitric oxide synthase but not enzyme activity in adult rat cardiomyocytes. *Free Radic. Biol. Med.* **2008**, 45, 994-1001. IF₂₀₀₈ = 5,399, wkład własny = 10%, liczba cytowań: 9

Moim wkładem jest wykonanie części pomiarów dotyczących analizy poziomu anionorodnika nadadtlenkowego, analiza i dyskusja wyników oraz udział w przygotowaniu manuskryptu.

[B19] J. Zielonka, B. Kalyanaraman. "ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis"-a critical commentary. *Free Radic. Biol. Med.* **2008**, 45, 1217-1219. IF₂₀₀₈ = 5,399, wkład własny = 40%, liczba cytowań: 23

Moim wkładem jest udział w przygotowaniu manuskryptu.

[B20] P. C. Y. Tang, L. Qin, J. Zielonka, J. Zhou, C. Matte-Martone, S. Bergaya, N. van Rooijen, W. D. Shlomchik, W. Min, W. C. Sessa, J. S. Pober, G. Tellides. MyD88-Dependent, Superoxide-Initiated Inflammation is Necessary for Flow-Mediated Inward Remodeling of Conduit Arteries. *J. Exp. Med.* **2008**, 205, 3159-3171. IF₂₀₀₈ = 15,463, wkład własny = 30%, liczba cytowań: 26

Moim wkładem jest wykonanie pomiarów dotyczących analizy poziomu anionorodnika nadadtlenkowego w tkankach in vivo, analiza i dyskusja wyników oraz udział w przygotowaniu manuskryptu.

[B21] H. Zhang, J. Zielonka, A. Sikora, J. Joseph, Y. Xu, B. Kalyanaraman. The effect of neighboring methionine residue on tyrosine nitration & oxidation in peptides treated with MPO, H₂O₂, & NO₂⁻ or peroxynitrite and bicarbonate: role of intramolecular electron transfer mechanism? *Arch. Biochem. Biophys.* **2009**, 484, 134-145. IF₂₀₀₉ = 3,046, wkład własny = 15%, liczba cytowań: 13

Moim wkładem jest zaprojektowanie i współwykonanie części pomiarów, analiza i dyskusja wyników oraz udział w przygotowaniu manuskryptu.

[B22] K. Chandran, D. Aggarwal, R.Q. Migrino, J. Joseph, D. McAllister, E.A. Konorev, W.E. Antholine, J. Zielonka, S. Srinivasan, N.G. Avadhani, B. Kalyanaraman. Doxorubicin Inactivates Myocardial Cytochrome c Oxidase in Rats: Cardioprotection by MitoQ. *Biophys. J.* **2009**, *96*, 1388-1398. IF₂₀₀₉ = **4,390**, wkład własny = **15%**, liczba cytowań: **52**

Moim wkładem jest zaprojektowanie i współwykonanie części pomiarów, analiza i dyskusja wyników oraz udział w przygotowaniu manuskryptu.

[B23] J. Amour, A. K. Brzezinska, D. Weihrauch, A. R. Billstrom, J. Zielonka, J. G. Krolikowski, M. W. Bienengraeber, D. C. Warltier, P. F. Pratt Jr, J. R. Kersten. Role of heat shock protein 90 and endothelial nitric oxide synthase during early anesthetic and ischemic preconditioning. *Anesthesiology* **2009**, *110*, 317-25. IF₂₀₀₉ = **5,354**, wkład własny = **10%**, liczba cytowań: **33**

Moim wkładem jest wykonanie części pomiarów dotyczących analizy poziomu anionorodnika ponadtlenkowego, analiza i dyskusja wyników oraz udział w przygotowaniu manuskryptu.

[B24] A. Sikora, J. Zielonka, M. Lopez, J. Joseph, B. Kalyanaraman. Direct oxidation of boronates by peroxynitrite: Mechanism and implications in fluorescence imaging of peroxynitrite. *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, *47*, 1401-1407. IF₂₀₀₉ = **5,791**, wkład własny = **15%**, liczba cytowań: **54**

Moim wkładem jest zaprojektowanie i współwykonanie części pomiarów, analiza i dyskusja wyników oraz udział w przygotowaniu manuskryptu.

[B25] V. A. Rao, S. R. Klein, S. J. Bonar, J. Zielonka, N. Mizuno, J. S. Dickey, P. W. Keller, J. Joseph, B. Kalyanaraman, E. Shacter. The Antioxidant Transcription Factor Nrf2 Negatively Regulates Autophagy and Growth Arrest Induced by the Anticancer Redox Agent Mitoquinone. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 34447-34459. IF₂₀₁₀ = **5,328**, wkład własny = **20%**, liczba cytowań: **38**

Moim wkładem jest zaprojektowanie i współwykonanie części pomiarów, analiza i dyskusja wyników oraz udział w przygotowaniu manuskryptu.

[B26] J. M. Myers, W. E. Antholine, J. Zielonka, C. R. Myers. The iron-chelating drug Triapine causes pronounced mitochondrial thiol redox stress. *Toxicol. Lett.* **2011**, *201*, 130-136. IF₂₀₁₁ = **3,230**, wkład własny = **15%**, liczba cytowań: **6**

Moim wkładem jest wykonanie pomiarów wewnątrzkomórkowego poziomu formy utlenionej i zredukowanej glutationu, analiza i dyskusja wyników oraz udział w przygotowaniu manuskryptu.

[B27] A. Sikora, J. Zielonka, M. Lopez, A. Dybala-Defratyka, J. Joseph, A. Marcinek, B. Kalyanaraman. Reaction between Peroxynitrite and Boronates: EPR Spin-Trapping, HPLC Analyses, and Quantum Mechanical Study of the Free Radical Pathway. *Chem. Res. Toxicol.*

2011, 24, 687-697. Artykuł wyróżniony w sekcji redakcyjnej „In This Issue”. IF₂₀₁₁ = 3,779, wkład własny = 20%, liczba cytowań: 24

Moim wkładem jest zaprojektowanie i współwykonanie części pomiarów, dyskusja wyników oraz udział w przygotowaniu manuskryptu.

[B28] G. Cheng, M. Lopez, J. Zielonka, A. D. Hauser, J. Joseph, D. McAllister, J. J. Rowe, S. L. Sugg, C. L. Williams, B. Kalyanaraman. Mitochondria-targeted nitroxides exacerbate fluvastatin-mediated cytostatic and cytotoxic effects in breast cancer cells. *Cancer Biol. Ther.* **2011, 12, 707-717. IF₂₀₁₁ = 2,636, wkład własny = 15%, liczba cytowań: 7**

Moim wkładem jest zaprojektowanie i współwykonanie części pomiarów, analiza i dyskusja wyników oraz udział w przygotowaniu manuskryptu.

[B29] P. Mukhopadhyay, B. Horváth, Z. Zsengellér, J. Zielonka, G. Tanchian, E. Holovac, M. Kechrid, V. Patel, I. E. Stillman, S. M. Parikh, J. Joseph, B. Kalyanaraman, P. Pacher. Mitochondrial-targeted antioxidants represent a promising approach for prevention of cisplatin-induced nephropathy. *Free Radic. Biol. Med.* **2012, 52, 497-506. IF₂₀₁₂ = 5,271, wkład własny = 15%, liczba cytowań: 43**

Moim wkładem jest zaprojektowanie i wykonanie części pomiarów dotyczących profilu farmakokinetycznego związku Mito-CP w myszach, analiza i dyskusja wyników oraz udział w przygotowaniu manuskryptu.

[B30] G. Cheng, J. Zielonka, B.P. Dranka, D. McAllister, A.C. Mackinnon, Jr., J. Joseph, B. Kalyanaraman “Mitochondria targeted drugs synergize with 2-deoxyglucose to trigger breast cancer cell death. *Cancer Res.* **2012, 72, 2634-2644. IF₂₀₁₂ = 8,650, wkład własny = 20%, liczba cytowań: 37**

Moim wkładem jest zaprojektowanie i współwykonanie części pomiarów, analiza i dyskusja wyników oraz udział w przygotowaniu manuskryptu.

[B31] B. P. Dranka, J. Zielonka, A. G. Kānthasamy, B. Kalyanaraman. Alterations in bioenergetic function induced by Parkinson’s disease mimetic compounds: Lack of correlation with superoxide generation. *J. Neurochem.* **2012, 122, 941-951. IF₂₀₁₂ = 3,973, wkład własny = 25%, liczba cytowań: 12**

Moim wkładem jest zaprojektowanie i współwykonanie części pomiarów dotyczącej wewnątrzkomórkowego poziomu anionorodnika ponadtlenkowego, analiza i dyskusja wyników oraz udział w przygotowaniu manuskryptu.

[B32] R. Michalski, J. Zielonka, M. Hardy, J. Joseph, B. Kalyanaraman. Hydropropidine: A novel, cell-impermeant fluorogenic probe for detecting extracellular superoxide. *Free Radic. Biol. Med.* **2013**, 54, 135-147. IF₂₀₁₃ = 5,710, wkład własny = 15%, liczba cytowań: 9

Moim wkładem jest zaprojektowanie części pomiarów, dyskusja wyników oraz udział w przygotowaniu manuskryptu.

[B33] A. Sikora, J. Zielonka, J. Adamus, D. Dębski, A. Dybala-Defratyka, B. Michalowski, J. Joseph, R. C. Hartley, M. P. Murphy, B. Kalyanaraman. Reaction between peroxyxynitrite and triphenylphosphonium-substituted arylboronic acid isomers – Identification of diagnostic marker products and biological implications. *Chem. Res. Toxicol.* **2013**, 26, 856-867. IF₂₀₁₃ = 4,190, wkład własny = 15%, liczba cytowań: 3

Moim wkładem jest współwykonanie części pomiarów, dyskusja wyników oraz udział w przygotowaniu manuskryptu.

[B34] B. P. Dranka, A. Gifford, A. Ghosh, J. Zielonka, J. Joseph, A. G. Kanthasamy, B. Kalyanaraman. Diapocynin prevents early Parkinson's disease symptoms in the Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2^{R1441G}) transgenic mouse. *Neuroscience Lett.* **2013**, 549, 57-62. IF₂₀₁₃ = 2,055, wkład własny = 15%, liczba cytowań: 7

Moim wkładem jest zaprojektowanie i współwykonanie części pomiarów, analiza i dyskusja wyników oraz udział w przygotowaniu manuskryptu.

[B35] G. Cheng, J. Zielonka, D. M. McAllister, A. C. Mackinnon Jr, J. Joseph, M. B. Dwinell, B. Kalyanaraman. Mitochondria-targeted vitamin E analogs inhibit breast cancer cell energy metabolism and promotes cell death. *BMC Cancer* **2013**, 13, 285. IF₂₀₁₃ = 3,319, wkład własny = 25%, liczba cytowań: 6

Moim wkładem jest zaprojektowanie i współwykonanie części pomiarów, analiza i dyskusja wyników oraz udział w przygotowaniu manuskryptu.

[B36] J. S. Dickey, Y. Gonzalez, B. Aryal, S. Mog, A. J. Nakamura, C. E. Redon, U. Baxa, E. Rosen, G. Cheng, J. Zielonka, P. Parekh, K. P. Mason, J. Joseph, B. Kalyanaraman, W. Bonner, E. Herman, E. Shacter, V. A. Rao. Mito-Tempol and dexrazoxane exhibit cardioprotective and chemotherapeutic effects through specific protein oxidation and autophagy in a syngeneic breast tumor preclinical model. *PLoS ONE* **2013**, 8, e70575. IF₂₀₁₃ = 3,534, wkład własny = 15%, liczba cytowań: 3

Moim wkładem jest zaprojektowanie i współwykonanie części pomiarów dotyczących dystrybucji in vivo i farmakokinetyki związku Mito-Tempol, analiza i dyskusja wyników oraz udział w przygotowaniu manuskryptu.

[B37] J. Zielonka, J.D. Lambeth, B. Kalyanaraman. On the use of L-012, a luminol-based chemiluminescent probe, for detecting superoxide and identifying inhibitors of NADPH oxidase: A re-evaluation. *Free Radic. Biol. Med.* **2013**, 65, 1310-1314. IF₂₀₁₃ = 5,710, wkład własny = 70%, liczba cytowań: 2

Moim wkładem jest koncepcja artykułu, zaprojektowanie i współwykonanie całości pomiarów, analiza, interpretacja i dyskusja wyników oraz przygotowanie wszystkich rysunków i wstępnej wersji manuskryptu.

[B38] R. Michalski, B. Michalowski, A. Sikora, J. Zielonka, B. Kalyanaraman. On the use of fluorescence lifetime imaging and dihydroethidium to detect superoxide in intact animals and ex vivo tissues: A reassessment. *Free Radic. Biol. Med.* **2014**, 67, 278-284. IF₂₀₁₃ = 5,710, wkład własny = 15%, liczba cytowań: 2

Moim wkładem jest zaprojektowanie części pomiarów, dyskusja wyników oraz udział w przygotowaniu manuskryptu.

[B39] T. Koto, R. Michalski, J. Zielonka, J. Joseph, B. Kalyanaraman. Detection and identification of oxidants formed during $\text{NO/O}_2^{\bullet-}$ reaction: A multi-well plate CW-EPR spectroscopy combined with HPLC analyses. *Free Radic. Res.* **2014**, 48, 478-486. IF₂₀₁₃ = 2,989, wkład własny = 15%, liczba cytowań: 1

Moim wkładem jest zaprojektowanie części pomiarów, dyskusja wyników oraz udział w przygotowaniu rysunków i manuskryptu.

[B40] A. Kumar, S.H. Chen, M.B. Kadiiska, J.S. Hong, J. Zielonka, B. Kalyanaraman, R.P. Mason. Inducible nitric oxide synthase is key to peroxynitrite-mediated, LPS-induced protein radical formation in murine microglial BV2 cells. *Free Radic. Biol. Med.* **2014**, 73, 51-59. IF₂₀₁₃ = 5,710, wkład własny = 15%, liczba cytowań: 2

Moim wkładem jest zaprojektowanie części pomiarów, dyskusja wyników oraz udział w przygotowaniu manuskryptu.

[B41] G. Cheng, J. Zielonka, D. McAllister, S. Tsai, M.B. Dwinell, B. Kalyanaraman. Profiling and targeting of cellular bioenergetics: Inhibition of pancreatic cancer cell proliferation. *Br. J. Cancer* **2014**, 111, 85-93. IF₂₀₁₃ = 4,817, wkład własny = 25%, liczba cytowań: 0

Moim wkładem jest zaprojektowanie i wykonanie części pomiarów, analiza i dyskusja wyników oraz udział w przygotowaniu manuskryptu.

[B42] M. Hardy, F. Poulhès, E. Rizzato, A. Rockenbauer, K. Banaszak, H. Karoui, M. Lopez, J. Zielonka, J. Vasquez-Vivar, S. Sethumadhavan, B. Kalyanaraman, P. Tordo, O. Ouari.

Mitochondrial targeted spin traps: synthesis, superoxide spin trapping and mitochondrial uptake. *Chem. Res. Toxicol.* **2014**, 27, 1155-1165. IF₂₀₁₃ = **4,190**, wkład własny = **15%**, liczba cytowań: **0**

Moim wkładem jest zaprojektowanie i wykonanie części pomiarów, analiza i dyskusja wyników oraz udział w przygotowaniu manuskryptu.

[B43] R. Michalski, J. Zielonka, E. Gapys, A. Marcinek, J. Joseph, B. Kalyanaraman. Real Time Measurements of Amino Acid and Protein Hydroperoxides using Coumarin Boronic Acid. *J. Biol. Chem.* **2014**, 289, 22536-22553. IF₂₀₁₃ = **4,600**, wkład własny = **15%**, liczba cytowań: **0**

Moim wkładem jest zaprojektowanie części pomiarów, dyskusja wyników oraz udział w przygotowaniu manuskryptu.

[B44] G. Shah, J. Zielonka, F. Chen, G. Zhang, Y. Cao, B. Kalyanaraman, W. See. H₂O₂ generation by BCG induces the cellular oxidative stress response required for BCG's direct effects on urothelial carcinoma tumor biology. *J. Urol.* **2014**, 192, 1238-1248. IF₂₀₁₃ = **3,753**, wkład własny = **5%**, liczba cytowań: **0**

Moim wkładem jest zaprojektowanie części pomiarów i dyskusja wyników.

[B45] B. P. Dranka, A. Gifford, D. McAllister, J. Zielonka, J. Joseph, C.I L. O'Hara, C. L. Stucky, A. G. Kanthasamy, B. Kalyanaraman. A novel mitochondrially-targeted apocynin derivative prevents hyposmia and loss of motor function in the leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2^{R1441G}) transgenic mouse model of Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* **2014**, 583, 159-164. IF₂₀₁₃ = **2,055**, wkład własny = **10%**, liczba cytowań: **0**

Moim wkładem jest zaprojektowanie i wykonanie części pomiarów, dyskusja wyników oraz udział w przygotowaniu manuskryptu.

[B46] R. Smulik, D. Debski, J. Zielonka, B. Michałowski, J. Adamus, A. Marcinek, B. Kalyanaraman, A. Sikora. Nitroxyl (HNO) reacts with molecular oxygen and forms peroxynitrite at physiological pH: Biological implications. *J. Biol. Chem.*, **2014**, 289, 35570-35581. IF₂₀₁₃ = **4,600**, wkład własny = **10%**, liczba cytowań: **0**

Moim wkładem jest udział w zaprojektowaniu części pomiarów, dyskusja wyników oraz udział w przygotowaniu manuskryptu.

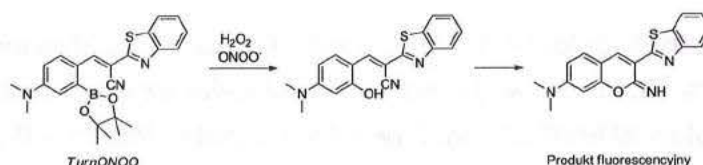
*Łączny IF publikacji niewchodzących w skład monotematycznego cyklu prezentacji to **206,113**;
całkowita liczba cytowań: **852***

5.2 Najbliższe plany badawcze

Moje najbliższe plany badawcze obejmują opracowanie nowych próbników i metod detekcji *RONS*, w tym (i) nowe analogi hydroetydyny; (ii) nowe próbniki boronowe; (iii) detekcja specyficznych produktów utleniania próbników w modelach *in vivo*; oraz (iv) określenie wpływu związków zawierających grupę tryfenylofosfoniową na poziom metabolitów ścieżki glikolizy i cyklu Krebsa w komórkach nowotworowych i odpowiednich komórkach normalnych.

(i) W ramach rozwoju technik pomiarowych anionorodnika ponadtlenkowego planujemy opracowanie analogu hydroetydyny, zawierającego wiązanie estrowe (*HE-ester*), ulegające hydrolizie pod wpływem wewnątrzkomórkowych esteraz. W reakcji tej powstaje pochodna *HE* zawierająca w fizjologicznym pH zjonizowaną grupę karboksylową (HE-COO^-), zapobiegającą wypływowi próbniaka z komórek. Wskutek tego możemy zwiększyć wewnątrzkomórkowe stężenie próbniaka, jak również zmniejszyć jego niespecyficzne utlenianie w mitochondriach. Ładunek ujemny może również obniżyć stopień wiązania produktów utleniania próbniaka z DNA, prowadząc do niższej toksyczności próbniaka *HE-ester* w porównaniu z próbniakiem *HE*. Toksyczność produktów utleniania *HE* jest jednym z głównych czynników ograniczających wartość stężenia próbniaka używanego w eksperymentach na liniach komórkowych. Dodatkowo, hydroliza próbniaka przed pomiarem prowadzi do otrzymania nowego próbniaka do selektywnych pomiarów anionorodnika ponadtlenkowego w przestrzeni zewnątrzkomórkowej.

(ii) Kolejnym nowym próbniakiem do badań *RONS*, który zaprojektowaliśmy jest *TurnONOO*, próbnik boronowy, który w procesie utleniania ulega zamknięciu pierścienia z utworzeniem fluorescencyjnego produktu (rycina 13). Potwierdzenie użyteczności tego próbniaka doprowadzi do dalszych modyfikacji struktury celem przesunięcia widma fluorescencji w kierunku podczerwieni, co umożliwi obrazowanie fluorescencyjne wybranych form *RONS* w modelach *in vivo*.



Rycina 13. Schemat utleniania i cyklizacji nowego próbniaka boronowego, *TurnONOO*, z utworzeniem fluorescencyjnego produktu.

(iii) Kolejny projekt realizowany jest celem zastosowania wybranych próbników do detekcji *RONS* w modelach *in vivo*. W tym celu, zastosowane będą próbniki boronowe, charakteryzujące się stabilnością we krwi (w przeciwieństwie do hydroetydyny, reagującej względnie szybko z białkami hemowymi zawartymi we krwi), i dające obok głównego, fenolowego produktu,

charakterystyczny produkt uboczny o potencjalnym zastosowaniu diagnostycznym dla nadtlenoazotynu (rycina 10). W pierwszych eksperymentach celem potwierdzenia możliwości detekcji nadtlenoazotynu *in vivo*, planujemy zastosować prosty model sepsy polegający na jednorazowym wstrzyknięciu *i.p.* endotoksyny bakteryjnej, lipopolisacharydu wraz z próbnikiem boronowym, *o*-MitoPhB(OH)₂.

(iv) W ramach prac nad zastosowaniem mitochondrialnych leków (*mitochondria-targeted agents*, MTA) do selektywnej inhibicji wzrostu komórek rakowych i mechanizmu działania tych związków, zamierzam zbadać wpływ wybranych związków z grupy MTA na poziom stacjonarny produktów pośrednich w procesach glikolizy oraz cyklu Krebsa, z wykorzystaniem techniki LC-MS/MS w liniach komórkowych raka piersi oraz trzustki oraz odpowiednich liniach komórek normalnych. Dodatkowo, zamierzam oznaczyć strumienie procesów glikolizy, fosforylacji oksydatywnej oraz glutaminolizy i wpływ na nie związków z grupy MTA, z użyciem analizatora strumieni pozakomórkowych (Seahorse XF96) oraz znaczonych izotopowo substratów komórkowych (¹³C₆-glukoza, ¹³C₅-glutamina) połączonych z analizą LC-MS/MS. Przewiduję, że wyniki tych badań pozwolą na rozwój wiedzy o mechanizmach selektywnego działania związków z grupy MTA względem komórek nowotworowych.

5.3 Udział w projektach badawczych

- NIH/NCI (2014-2019), U01 CA178960, *Targeting Pancreatic Cancer Energy Metabolism, Tumor Growth, and Metastasis*, wykonawca projektu
- NIH Director's Pioneer Award Grant (2009-2015), 8DP1HL17650-04, *Protein Misfolding Diseases and Oxido-Reductive Pathways*, wykonawca projektu
- Healthy Wisconsin (2014-2015), *Hydrogen Sulfide (H₂S) Intoxication in Brain Abscesses*, wykonawca projektu
- ERDF (2010-2015), JCET, No. POIG.01.01.02-00-069/09, *Śródbłonek naczyniowy w chorobach cywilizacyjnych: od badań poznawczych do oferty innowacyjnego leku o działaniu śródbłonkowym*, konsultant projektu
- NIH/NCI (2010-2015), R01 CA152810, *Mitochondria-targeted agents in Breast Cancer*, wykonawca projektu
- NIH/NINDS (2000-2014), R01 NS039958, *Neuroprotection by Mitochondria-targeted Antioxidants*, wykonawca projektu

- NIH/NHLBI (1999-2012), R01 HL063119, *Nitric Oxide-Mediated Oxidation/Nitration in Membranes*, wykonawca projektu
- NIH/NINDS (2000-2010), R01 NS040494, *Bicarbonate Enhances Peroxidation of Sod/ALS Mutants*, wykonawca projektu
- NIH/NHLBI (2003-2009), R01 HL073056, *Peroxide, NO and Iron Signaling in Endothelial Damage*, wykonawca projektu
- NIH/NCI (1999-2008), R01 CA077822, *eNOS & the Radical Mechanism of Antitumor Anthracyclines*, wykonawca projektu
- NIH/NHLBI (2002-2007), P01HL68769, *Vascular Signaling by Free Radicals*, wykonawca projektu

5.4 Staże naukowe

- 2014, listopad – grudzień – *visiting professor* - Aix-Marseille Universite, Marsylia, Francja – dwa wykłady na temat metod pomiarowych w badaniach reaktywnych form tlenu i azotu w układach biologicznych, konsultacje naukowe, praca nad wspólnymi projektami badawczymi
- 2013, listopad – *visiting scientist* - Broad Institute of Harvard and MIT, Cambridge, MA, USA – opracowanie metody wysokoprzepustowych badań przesiewowych (high throughput screening) z wykorzystaniem nowych próbników profluorescencyjnych; przetestowanie metody na bibliotece 2000 związków
- 2004-2007 – *postdoctoral fellow* – Department of Biophysics, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, WI, USA – badania nad mechanizmem utleniania hydroetydyny, opracowanie metod pomiarów anionorodnika ponadtlenkowego w wybranych układach biologicznych

5.5 Współpraca międzynarodowa

Podczas ostatnich 10 lat badań związanych z rozwojem metod detekcji reaktywnych form tlenu i azotu w układach biologicznych, miałem możliwość służyć jako konsultant oraz udostępnić komercyjnie niedostępne związki wielu grupom badawczym w Stanach Zjednoczonych, Europie oraz Azji. Dodatkowo, sporadycznie przeprowadzałem analizy chromatograficzne i EPR ekstraktów z komórek i tkanek przysyłanych z innych laboratoriów w

obrębie USA. Działalność ta znajduje odzwierciedlenie we współautorstwie (jeśli moja rola nie ograniczała się tylko do technicznej analizy próbek), bądź w sekcji podziękowań artykułów. Do długoterminowych partnerów naukowych w ramach współpracy badawczej (pomijając oczywistą współpracę między Medical College of Wisconsin i Politechniką Łódzką), zaliczam jednak jedynie następujących naukowców:

- Dr Ron Mason, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA – *współpraca skierowana na rozwój nowych metod detekcji reaktywnych form tlenu i azotu w układach biologicznych*
- Dr Pal Pacher, National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism, Rockville, MD, USA – *współpraca skierowana na określenie terapeutycznej i protekcyjnej funkcji MTA (mitochondria targeted agents) w chemioterapii*
- Dr Ashutosh Rao, U.S. Food and Drug Administration, Bethesda, MD, USA – *mechanizmy cytotoksyczności związku MitoQ (mitochinonu)*
- Dr David Lambeth, Emory University, Atlanta, GA, USA – *poszukiwania nowych inhibitorów oksydazy NADPH*
- Dr Micael Hardy, Aix-Marseille Universite, Marsylia, Francja – *rozwój nowych próbników reaktywnych form tlenu i azotu; opracowanie nowych potencjalnych terapeutyków skierowanych do mitochondriów*

5.6 Najważniejsze nagrody i wyróżnienia związane z działalnością naukową i dydaktyczną

- 2012 – *Top Reviewer 2012* – nagroda przyznana przez radę redakcyjną czasopisma *Free Radical Biology & Medicine* za recenzowanie składanych manuskryptów
- 2004 – Nagroda Zespołowa Ministra Edukacji Narodowej i Sportu za współautorstwo cyklu prac dotyczących „Odkrycia terapeutycznej funkcji wybranych analogów koenzymu NAD”
- 2004 – Nagroda Zespołowa II stopnia za cykl prac nt. „Radiacyjne i fotochemiczne generowanie nietrwałych połączeń chemicznych o istotnym znaczeniu poznawczym”
- 2004 – *Najlepszy Asystent* w konkursie *Belfer roku 2004* organizowanym przez Samorząd Studencki Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej oraz Zrzeszenie Studentów Polskich

5.7 Udział w komitetach redakcyjnych i radach naukowych czasopism

- *Free Radical Biology & Medicine*, 2012 do obecnie, Elsevier (IF₂₀₁₃ = 5,710) – członek komitetu redakcyjnego (*Editorial Board*)
- *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014 do obecnie, Hindawi (IF₂₀₁₃ = 3,363) – członek komitetu redakcyjnego (*Editorial Board*)

5.8 Członkostwo w międzynarodowych i krajowych organizacjach oraz towarzystwach naukowych

- *American Chemical Society*, 2014 do obecnie – członek
- *American Association for Cancer Research*, 2013 do obecnie – członek
- *Society for Free Radical Biology and Medicine*, 2008 do obecnie – członek

5.9 Udział w konferencjach i komitetach organizacyjnych konferencji

A. Konferencje (w zestawieniu wymienione są konferencje międzynarodowe, na których uczestniczyłem osobiście i przedstawiałem wyniki badań):

1. *Measuring Cellular Oxidizing Species with Small Molecule Luminescent Probes* – Jacek Zielonka – Society for Free Radical Biology and Medicine 21st Annual Meeting, pre-meeting workshop, Seattle, WA, USA, listopad 2014 – **zaproszony wykład**
2. *Targeting NADPH oxidases in cardiovascular diseases: Development of assays for high throughput screening of Nox2 inhibitors* - Jacek Zielonka, Monika Zielonka, Lynn VerPlank, Thota Ganesh, Aiming Sun, Gang Cheng, Catherine Communal, William O'Brien, David Lambeth, B. Kalyanaraman - Cardiovascular Redox Signaling Symposium, Milwaukee, USA, listopad 2014 – **zaproszony wykład**
3. *Free radical metabolism and bioenergetic changes in cardiovascular diseases and cancer* – Jacek Zielonka - First Adriatic Symposium on Biophysical Approaches in Biomedical Studies, Split, Chorwacja, sierpień 2014 – **zaproszony wykład**
4. *In search for new inhibitors of NADPH oxidases: high throughput screening of bioactive compounds libraries* - Jacek Zielonka, Lynn VerPlank, Monika Zielonka, Gang Cheng,

- Catherine Communal, Balaraman Kalyanaraman – Oxygen Radicals Gordon Conference, Ventura, CA, USA, luty 2014 – poster
5. *On the chemiluminescent probes for superoxide: Is L-012 probe a reliable tool for detection and quantification of $O_2^{\bullet-}$?* – Jacek Zielonka, David Lambeth, B. Kalyanaraman – Society for Free Radical Biology and Medicine 20th Annual Meeting, San Antonio, TX, USA, listopad 2013 – poster
 6. *High throughput screening of inhibitors of NADPH oxidases (Nox) – a combination of fluorescence, HPLC and EPR assays for reliable identification of novel Nox inhibitors* - Zielonka J., Cheng G., Zielonka M., Ganesh T., Sun A., Joseph J., Michalski R., O'Brien W., Lambeth D., Kalyanaraman B. – IX International Workshop on EPR in Biology and Medicine, Kraków, Polska, październik 2013 – **zaproszony wykład**
 7. *New methods of detection of reactive oxygen and nitrogen species: from mechanistic studies to biological applications* – Jacek Zielonka, Adam Sikora, Radosław Michalski, Micaël Hardy, Brian Dranka, Joy Joseph, Jan Adamus, B. Kalyanaraman – The 6th European Young Investigator Conference, Słubice, Polska, czerwiec 2013 – **zaproszony wykład**
 8. *Bioenergetic changes in glycolysis, Krebs's cycle, and glutaminolysis in pancreatic cells treated with mitochondria-targeted cationic drugs* - Gang Cheng, Jacek Zielonka, Joy Joseph, Balaraman Kalyanaraman - American Association for Cancer Research Annual Meeting, Washington D.C., USA, kwiecień 2013 – poster
 9. *Mitochondria-targeted chromanol inhibits breast cancer cell energy metabolism and promotes cell death* – Jacek Zielonka, Gang Cheng, Donna M. McAllister, A. Craig Mackinnon Jr., Joy Joseph, Michael B. Dwinell and Balaraman Kalyanaraman – Target Cancer Metabolism, Boston, MA, USA, styczeń 2013 - poster
 10. *In search for inhibitors of NADPH oxidases: New assays for superoxide and hydrogen peroxide as a platform for high throughput screening (HTS) of inhibitors of NADPH oxidases* – Jacek Zielonka, Monika Zielonka, Thota Ganesh, Aiming Sun, Gang Cheng, William O'Brien, David Lambeth, B. Kalyanaraman – Society for Free Radical Biology and Medicine 19th Annual Meeting, San Diego, CA, USA, listopad 2012 – poster
 11. *Kinetic aspects of activation of boronate-based iron prochelators in cell-free and cellular systems* – Jacek Zielonka, Filip Kielar, Monika Zielonka, Adam Sikora, Katherine J. Franz, B. Kalyanaraman – IARC Workshop on Reactive Intermediates for Graduate Students and Young Scholars, Spała, Polska, czerwiec 2012 – **zaproszony wykład**

12. *Development of new assays for high-throughput screening of NADPH oxidase inhibitors* - Jacek Zielonka, Monika Zielonka, Thota Ganesh, Aiming Sun, Joy Joseph, Gang Cheng, William O'Brien, David Lambeth, B. Kalyanaraman – NADPH Oxidases Gordon Conference, Waterville Valley Resort, Waterville Valley, NH, USA, czerwiec 2012 – **wybrana prezentacja ustna**
13. *Kinetic aspects of activation of boronate-based iron prochelators in cell-free and cellular systems* - Jacek Zielonka, Filip Kielar, Monika Zielonka, Adam Sikora, Katherine J. Franz, B. Kalyanaraman – Oxygen Radicals Gordon Conference, Ventura, CA, USA, luty 2012 – poster
14. *Dual antioxidant activity of boronate-based prochelators: scavenging peroxynitrite and metal ion chelation* – Jacek Zielonka, Filip Kielar, Adam Sikora, Katherine J. Franz, B. Kalyanaraman – Society for Free Radical Biology and Medicine 18th Annual Meeting, Atlanta, GA, USA, listopad 2011 – poster
15. *Inhibitors of NADPH oxidase decrease peroxynitrite formation in activated macrophages* – Jacek Zielonka, Monika Zielonka, Thota Ganesh, Aiming Sun, David Lambeth, B. Kalyanaraman – Society for Free Radical Biology and Medicine 18th Annual Meeting, Atlanta, GA, USA, listopad 2011 – poster
16. *Global profiling of reactive oxygen and nitrogen species in cell-free and model cellular systems – real time fluorescence monitoring and HPLC measurements* – Jacek Zielonka, Monika Zielonka, Adam Sikora, Jan Adamus, Joy Joseph, Micael Hardy, Olivier Ouari, and B. Kalyanaraman – Society for Free Radical Biology and Medicine 17th Annual Meeting, Orlando, FL, USA, listopad 2010 – poster
17. *Reduction of mitochondrial reserve capacity in endothelial cells by nitric oxide and superoxide – detection and quantitation of peroxynitrite formed from co-generated $\cdot\text{NO}$ and $\text{O}_2^{\cdot-}$* – Jacek Zielonka, Brian P. Dranka, Monika Zielonka, Joy Joseph, Micael Hardy, Adam Sikora, B. Kalyanaraman – Society for Free Radical Biology and Medicine 17th Annual Meeting, Orlando, FL, USA, listopad 2010 – poster
18. *Detection of peroxynitrite and its precursors, nitric oxide and superoxide radical anion in cell-free and cellular systems* - Zielonka J., Sikora A., Joseph J., Hardy M., Ouari O., Adamus J., Kalyanaraman B. – VIII International Workshop on EPR in Biology and Medicine, Kraków, Polska, październik 2010 – **zaproszony wykład**
19. *Detection of peroxynitrite by boronate-based probes: EPR, fluorescence and HPLC studies* - Jacek Zielonka, Adam Sikora, Marcos Lopez, Micael Hardy, Monika Zielonka, Joy

- Joseph, B. Kalyanaraman – EPR 2010 Conference, San Juan, Puerto Rico, maj 2010 – **zaproszony wykład**
20. *Mechanistic analysis of the reaction of ONOO⁻ with boronate-based probes* - Jacek Zielonka, Adam Sikora, Marcos Lopez, Joy Joseph, B. Kalyanaraman – Oxygen Radicals Gordon Conference, Ventura, CA, USA, luty 2010 – poster
 21. *Monitoring of peroxynitrite release from activated macrophages: The use of novel boronate-based fluorogenic probes* – Jacek Zielonka, Adam Sikora, Monika Zielonka, Joy Joseph, Micael Hardy, B. Kalyanaraman – Society for Free Radical Biology and Medicine 16th Annual Meeting, San Francisco, CA, USA, listopad 2009 – poster
 22. *Superoxide reaction with hydroethidine and mito-hydroethidine. EPR, UV-Vis absorption, fluorescence and HPLC studies* - Zielonka J., Sarna T., Kalyanaraman B. – VII International Workshop on EPR in Biology and Medicine, Kraków, Polska, październik 2007 – **zaproszony wykład**
 23. *The reaction of superoxide with hydroethidine and its mitochondria-targeted analog: pulse radiolysis and steady-state analyses* - Jacek Zielonka, Tadeusz Sarna, Joan E. Roberts, James F. Wishart and B. Kalyanaraman – Society for Free Radical Biology and Medicine 13th Annual Meeting, Denver, CO, USA, listopad 2006 – poster
 24. *Pyridinyl radicals as electron donors* – Jacek Zielonka, Jerzy Gębicki – International Conference on Reactive Intermediates and Reaction Mechanisms, Ascona, Szwajcaria, lipiec 2002 – poster
 25. *Ionic Liquids as a Novel Glassy Medium for Direct Characterization of Radical Ions* – Jacek Zielonka, Andrzej Marcinek, Jerzy Gębicki, Charles M. Gordon, Ian R. Dunkin – The Chemistry and Physics of Matrix Isolated Species, Szklarska Poręba, Polska, lipiec 2001 – poster
 26. *Molecular mechanisms of pyridinium salts cytotoxicity: reactivity of pyridinyl radicals against oxygen* – Jacek Zielonka, Jerzy Gębicki – NATO Advanced Study Institute on Free Radicals, Nitric Oxide, and Inflammation: Molecular, Biochemical, and Clinical Aspects, Antalya, Turcja, wrzesień 2001 – poster
 27. *Reactive Intermediates Generated by One-electron Oxidation of NADH* – Jacek Zielonka, Jan Adamus, Andrzej Marcinek, Jerzy Gębicki – EPA Graduate Student Symposium in Photochemistry, Fribourg, Szwajcaria, luty 2010 – poster

28. *Generation of Radical Cations in Frozen Ionic Liquids* – Jacek Zielonka, Andrzej Marcinek, Jerzy Gębicki, Charles M. Gordon and Ian R. Dunkin – EPA Graduate Student Symposium in Photochemistry, Fribourg, Szwajcaria, luty 2010 – poster
29. *Photochemically Induced Dehydration of 1-Benzyl-3-acetyl-6-hydroxy-1,4,5,6-tetrahydropyridine* – Jacek Zielonka, Jan Adamus, Andrzej Marcinek, Jerzy Gębicki – EPA Graduate Student Symposium in Photochemistry, Fribourg, Szwajcaria, luty 2010 – poster
30. *Reactive Intermediates Generated by One-electron Oxidation of NADH* – Jacek Zielonka, Jan Adamus, Andrzej Marcinek and Jerzy Gębicki – International Workshop on Reactive Intermediates IWRI'99, Szczyrk, Polska, sierpień 1999 – poster

B. Udział w organizacji konferencji

1. Oxygen Radicals Gordon Conference, Ventura, CA, USA, luty 2014 – *session chair*
2. IARC Workshop on Reactive Intermediates for Graduate Students and Young Scholars, Spała, Polska, czerwiec 2012 – *session chair*

5.10 Recenzowanie publikacji

W ciągu ostatnich 10 lat recenzowałem artykuły w różnych czasopismach naukowych (wymienionych poniżej) służąc jako ekspert w dziedzinie chemii reakcji redoks w układach z produkcją reaktywnych produktów pośrednich oraz w dziedzinie chemii próbników redoks i detekcji reaktywnych form tlenu i azotu w układach biologicznych. Jako członek komitetu redakcyjnego czasopisma *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* zajmuję się również wyborem recenzentów i podejmuję ostateczne decyzje dotyczące przyjęcia artykułów do druku w tym periodyku. Poniżej przedstawiam listę czasopism wraz z liczbą złożonych recenzji, wg stanu na dzień 21 stycznia 2015 r.:

- *Free Radical Biology & Medicine* – 195 recenzji
- *Sensors and Actuators B: Chemical* – 11 recenzji
- *Nitric Oxide* – 5 recenzji
- *Biochimica & Biophysica Acta* – 2 recenzje
- *Chemical Research in Toxicology* – 2 recenzje

- *Journal of Photochemistry and Photobiology* – 2 recenzje
- *FEBS Letters* – 1 recenzja
- *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* – 1 recenzja
- *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* – 1 recenzja
- *Nature Communications* – 1 recenzja
- *Chemical Science* – 1 recenzja
- *Journal of Applied Physiology* – 1 recenzja
- *Free Radical Research* – 1 recenzja
- *Journal of Physical Chemistry* – 1 recenzja
- *Laboratory Investigation* – 1 recenzja
- *PLoS One* – 1 recenzja
- *Radiation Research* – 1 recenzja
- *Redox Reports* – 1 recenzja
- *Radiation Physics and Chemistry* – 1 recenzja

6. Działalność dydaktyczna

Podczas studiów doktoranckich (1998-2002 r.) prowadziłem następujące zajęcia ze studentami kierunków magisterskich oraz inżynierskich:

- Informatyka, laboratorium
- Chemia fizyczna, laboratorium
- Język angielski w chemii, ćwiczenia

W okresie po doktoracie (2002 – 2004 r.), przed wyjazdem na staż podoktorski, prowadziłem następujące przedmioty:

- Chemia fizyczna, ćwiczenia

- Podstawy informatyki, wykład + laboratorium

Za sposób prowadzenia zajęć w tym okresie zostałem wyróżniony dyplomem *Najlepszy Asystent* w konkursie *Belfer roku 2004* organizowanym przez Samorząd Studencki Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej oraz Zrzeszenie Studentów Polskich.

7. Udział w zespołach eksperckich i konkursowych

- Recenzent posterów i prezentacji ustnych w celu wyboru laureatów konkursu *Young Investigator Award – Society for Free Radical Biology and Medicine 17th Annual Meeting*, Orlando, FL, USA, listopad 2010

8. Syntetyczne dane dotyczące dorobku naukowego

Poniżej przedstawiam dane sumaryczne dotyczące mojego dorobku naukowego, w tym dane uzyskane z bazy *Web of Science*, z dnia 19/01/2015.

- *Web of Science author identifier*: **N-9546-2014**
- Publikacje z listy *JCR*: **61**
- Sumaryczny *IF*: **265,773**
- Łączna liczba cytowań (wg. *JCR*): **1379**
- Cytowania obce w periodykach *JCR*: **1196**
- Autocytowania w periodykach *JCR*: **183**
- Indeks Hirscha: **24**
- Konferencje międzynarodowe: **29**
- Wykonawstwo w projektach badawczych: **10**

21.01.2015 *Janusz Ziśka*