

Załącznik 2

**Autoreferat przedstawiający opis dorobku i osiągnięć naukowych
wraz z informacją o osiągnięciach dydaktycznych i opiece naukowej nad studentami**

dr inż. Adam Sikora
Międzyresortowy Instytut Techniki Radiacyjnej
Wydział Chemiczny Politechniki Łódzkiej

**Mechanistyczne aspekty reaktywności i wykorzystanie wybranych próbników
molekularnych przeznaczonych do detekcji reaktywnych form tlenu i azotu**

dr inż. Adam Sikora

Międzyresortowy Instytut Techniki Radiacyjnej

Wydział Chemiczny Politechniki Łódzkiej

Spis treści

1. Dane osobowe.....	7
2. Wykształcenie.....	7
3. Dotychczasowe zatrudnienie w jednostkach naukowych.....	7
4. Syntetyczne dane dotyczące dorobku naukowego.....	8
5. Osiągnięcia naukowe zgłoszone jako podstawa do przewodu habilitacyjnego.....	8
6. Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze.....	37
6.1. Spis pozostałych publikacji naukowych.....	37
6.2. Kierowanie projektami naukowymi oraz udział w takich projektach.....	42
6.3. Udział w konferencjach i seminariach naukowych i ich organizacja.....	43
6.4. Członkostwo w towarzystwach naukowych.....	49
6.5. Staże w krajowych i zagranicznych ośrodkach naukowych.....	49
6.6. Międzynarodowa i krajowa współpraca naukowa.....	50
6.7. Recenzowanie publikacji w czasopismach międzynarodowych.....	51
6.8. Udział w zespołach eksperckich i konkursowych.....	51
6.9. Najważniejsze nagrody i wyróżnienia związane z działalnością naukową.....	52
7. Działalność dydaktyczna.....	52
7.1. Prowadzone zajęcia dydaktyczne.....	52
7.2. Opracowane programy nauczania przedmiotów akademickich.....	53
7.3. Prace inżynierskie wykonane pod kierunkiem habilitanta.....	53
7.4. Prace magisterskie wykonane pod kierunkiem habilitanta.....	54
7.5. Opieka naukowa nad doktorantami w charakterze promotora pomocniczego.....	54
8. Działalność organizacyjna.....	55

1. Dane osobowe

Imię i nazwisko: Adam Bartłomiej Sikora

Data i miejsce urodzenia: 21 marca 1977 r., Łódź

2. Wykształcenie

2007 r. Stopień doktora nauk chemicznych, tytuł rozprawy doktorskiej: *Procesy powstawania kationów nitreniowych towarzyszące reakcjom przeniesienia elektronu*, promotor: prof. dr hab. inż. Andrzej Marcinek, Wydział Chemiczny Politechniki Łódzkiej

2002 r. Tytuł zawodowy magistra inżyniera, tytuł pracy dyplomowej *Reaktywność nikotynamidu i jego metabolitów względem reaktywnych form tlenu*, praca wykonana pod kierunkiem prof. dr. hab. inż. Jerzego Gębickiego, Wydział Chemiczny Politechniki Łódzkiej

3. Dotychczasowe zatrudnienie w jednostkach naukowych

2006–2009 asystent, Międzyresortowy Instytut Techniki Radiacyjnej, Wydział Chemiczny Politechniki Łódzkiej

2008–2009 postdoctoral fellow, Department of Biophysics, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, Wisconsin, USA

2009–obecnie adiunkt, Międzyresortowy Instytut Techniki Radiacyjnej, Wydział Chemiczny Politechniki Łódzkiej

4. Syntetyczne dane dotyczące dorobku naukowego

Poniżej przedstawiam dane dotyczące mojego dorobku naukowego, w tym dane uzyskane z bazy *Scopus*, z dnia 9 stycznia 2019 roku

Łączna liczba publikacji: **35 (29 po doktoracie)**

Liczba publikacji stanowiących osiągnięcie: **11**

Liczba cytowań (wg bazy danych *Scopus*): **952**

Liczba cytowań bez autocytowań (wg bazy danych *Scopus*): **823**

Indeks Hirscha: **15**

Sumaryczny IF wszystkich publikacji: **176,02**

Sumaryczny IF 11 prac stanowiących osiągnięcie: **98,95**

Liczba cytowań 11 prac stanowiących osiągnięcie (wg bazy danych *Scopus*): **509**

5. Osiągnięcia naukowe zgłoszone jako podstawa do przewodu habilitacyjnego

a. Tytuł osiągnięcia naukowego:

**Mechanistyczne aspekty reaktywności i wykorzystanie wybranych próbników
molekularnych przeznaczonych do detekcji reaktywnych form tlenu i azotu**

Podstawę osiągnięcia stanowi cykl 11 publikacji 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. 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. **47** (2009) 1401–7. IF₂₀₀₉ = **6,081**, wkład własny = **70%**, liczba cytowań: **158**

Moim wkładem jest zaprojektowanie i wykonanie większości eksperymentów, w tym wszystkich badań reaktywności związków boronowych, analiza, interpretacja i dyskusja wyników oraz przygotowanie większości rysunków i wstępnej wersji manuskryptu.

H2. 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. **285** (2010) 14210–6. **JBC Paper of the Week**. IF₂₀₁₀ = **5,328**, wkład własny = **40%**, liczba cytowań: **118**

Moim wkładem jest zaprojektowanie i wykonanie części eksperymentów, w tym badań utleniania kwasu 7-boronokumarynowego przez nadtlendioazotyn generowany przy różnych stosunkach generowanych równolegle strumieni anionorodnika ponadtlennkowego i tlenu azotu, analiza, interpretacja i dyskusja wyników tych eksperymentów oraz przygotowanie odpowiednich rysunków do wstępnej wersji manuskryptu, a także konsultacje finalnej wersji manuskryptu.

H3. A. Sikora, J. Zielonka, M. Lopez, A. Dybała-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. **24** (2011) 687–97. IF₂₀₁₁ = **3,779**, wkład własny = **70%**, liczba cytowań: **53**

Moim wkładem jest zaprojektowanie i wykonanie, bądź współwykonanie większości eksperymentów, w tym badań przeprowadzonych z wykorzystaniem techniki pułapkowania spinowego, analiza, interpretacja i dyskusja wyników oraz przygotowanie rysunków i wstępnej wersji manuskryptu.

H4. A. Sikora, J. Zielonka, J. Adamus, D. Dębski, A. Dybała-Defratyka, B. Michałowski, J. Joseph, R.C. Hartley, M.P. Murphy, B. Kalyanaraman, *Reaction between peroxynitrite and triphenylphosphonium-substituted arylboronic acid isomers: identification of diagnostic marker products and biological implications*, Chem. Res. Toxicol. **26** (2013) 856–67. IF₂₀₁₃ = **4,190**, wkład własny = **70%**, liczba cytowań: **27**

Moim wkładem jest zaprojektowanie i wykonanie bądź współwykonanie większości eksperymentów, w tym badań kinetycznych reaktywności badanych próbników boronowych dedykowanych do detekcji nadtlenu wodoru i nadtlendioazotynu w mitochondriach, przeprowadzonych z wykorzystaniem techniki radiolizy impulsowej, oraz eksperymentów przeprowadzonych techniką pułapkowania spinowego, analiza wydajności powstających

produktów oraz interpretacja i dyskusja wyników a także przygotowanie większości rysunków i wstępnej wersji manuskryptu.

H5. R. Smulik, D. Dębski, 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. **289** (2014) 35570–81. **IF₂₀₁₄ = 4,573**, wkład własny = **40%**, liczba cytowań: **32**

Moim wkładem jest ogólna koncepcja pracy, zaprojektowanie w zarysie większości eksperymentów, w tym opracowanie nowej metody badania reaktywności azanonu (nitroksylu, HNO) z wykorzystaniem metody reakcji konkurencyjnych i profluorescencyjnych próbników boronowych wykorzystywanych w tej metodzie do detekcji powstającego w układzie nadtlenoazotynu, interpretacja i dyskusja wyników oraz przygotowanie ostatecznej wersji manuskryptu i zapewnienie środków finansowych.

H6. K. Dębowska, D. Dębski, B. Michałowski, A. Dybała-Defratyka, T. Wójcik, R. Michalski, M. Jakubowska, A. Selmi, R. Smulik, Ł. Piotrowski, J. Adamus, A. Marcinek, S. Chłopicki, A. Sikora, Characterization of fluorescein-based monoboronate probe and its application to the detection of peroxynitrite in endothelial cells treated with doxorubicin, Chem. Res. Toxicol. **29** (2016) 735–46. **IF₂₀₁₆ = 3,278**, wkład własny = **40%**, liczba cytowań: **13**

Moim wkładem jest ogólna koncepcja pracy, zaprojektowanie w zarysie większości eksperymentów, interpretacja i dyskusja wyników oraz przygotowanie ostatecznej wersji manuskryptu i zapewnienie środków finansowych.

H7. D. Dębski, R. Smulik, J. Zielonka, B. Michałowski, M. Jakubowska, K. Dębowska, J. Adamus, A. Marcinek, B. Kalyanaraman, A. Sikora, Mechanism of oxidative conversion of Amplex® Red to resorufin: pulse radiolysis and enzymatic studies, Free Radic. Biol. Med. **95** (2016) 323–32. **IF₂₀₁₆ = 5,606**, wkład własny = **40%**, liczba cytowań: **24**

Moim wkładem jest ogólna koncepcja pracy, zaprojektowanie w zarysie większości eksperymentów, wykonanie wstępnych badań z wykorzystaniem techniki radiolizy impulsowej, dotyczących reaktywności próbniaka Amplex® Red względem wybranych

jednoelektronowych utleniaczy, interpretacja i dyskusja wyników, przygotowanie ostatecznej wersji manuskryptu i zapewnienie środków finansowych.

H8. R. Smulik-Izydorczyk, A. Mesjasz, A. Gerbich, J. Adamus, R. Michalski, A. Sikora, *A kinetic study on the reactivity of azanone (HNO) toward its selected scavengers: insight into its chemistry and detection*, Nitric Oxide **69** (2017) 61–8. IF₂₀₁₇ = **4,367**, wkład własny = **40%**, liczba cytowań: **3**

Moim wkładem jest ogólna koncepcja pracy, zaprojektowanie w zarysie większości eksperymentów, interpretacja i dyskusja wyników oraz przygotowanie ostatecznej wersji manuskryptu i zapewnienie środków finansowych.

H9. J. Zielonka, J. Joseph, A. Sikora, M. Hardy, O. Ouari, J. Vasquez-Vivar, G. Cheng, M. Lopez, B. Kalyanaraman, *Mitochondria-targeted triphenylphosphonium-based compounds: syntheses, mechanisms of action, and therapeutic and diagnostic applications*, Chem. Rev. **117** (2017) 10043–120. IF₂₀₁₇ = **52,613**, wkład własny = **20%**, liczba cytowań: **79**

Moim wkładem jest przygotowanie części przeglądu dotyczącej własności próbników molekularnych dedykowanych do detekcji w obrębie mitochondriów reaktywnych form tlenu, azotu i siarki (z wyłączeniem części poświęconej pułapkom spinowym) oraz kilku innych pomniejszych fragmentów pracy.

H10. R. Smulik-Izydorczyk, K. Dębowska, J. Pięta, R. Michalski, A. Marcinek, A. Sikora, *Fluorescent probes for the detection of nitroxyl (HNO)*, Free Radic. Biol. Med. **128** (2018) 69–83. IF₂₀₁₇ = **6,020**, wkład własny = **60%**, liczba cytowań: **2**

Moim wkładem jest ogólna koncepcja pracy oraz przygotowanie jej większej części poświęconej omówieniu własności 3 klas fluorescencyjnych próbników przeznaczonych do detekcji HNO – próbników zbudowanych z układów fluoroforowych połączonych kowalencyjnie z kompleksami jonów miedzi Cu²⁺, próbników opartych na wysokiej reaktywności HNO względem fosfin aromatycznych oraz próbników będących estrami związków fluorescencyjnych i kwasu 2-merkaptu-2-metylopropionowego. Przygotowałem również ostateczną wersję manuskryptu.

H11. R. Smulik-Izydorczyk, M. Rostkowski, A. Gerbich, D. Jarmoc, J. Adamus, A. Leszczyńska, R. Michalski, A. Marcinek, K. Kramkowski, A. Sikora, *Decomposition of Piloty's acid derivatives – Toward the understanding of factors controlling HNO release*, Arch. Biochem. Biophys. **661** (2019) 132–44. IF₂₀₁₇ = **3,118**, wkład własny = **40%**, liczba cytowań: **0**

Mój wkład polegał na opracowaniu ogólnej koncepcji pracy, zaprojektowaniu w zarysie większości eksperymentów, interpretacji i dyskusji wyników oraz przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu i zapewnieniu środków finansowych.

c. Omówienie celu naukowego wyżej wymienionych prac i osiągniętych wyników

Wprowadzenie

Przedmiotem artykułów przedstawionych jako osiągnięcie naukowe, będące podstawą niniejszej rozprawy habilitacyjnej, jest charakterystyka mechanistycznych aspektów reaktywności wybranych próbników molekularnych zaprojektowanych do detekcji reaktywnych form tlenu, bądź reaktywnych form azotu, oraz praktyczne wykorzystanie tych próbników w układach chemicznych, enzymatycznych oraz biologicznych.

Na przestrzeni ostatnich 50 lat dokonano ogromnego postępu w opisie chemicznej reaktywności i rozumieniu biologicznej roli reaktywnych form tlenu (**RFT**, ang. **ROS**) i reaktywnych form azotu (**RFA**, ang. **RNS**), do których zaliczyć należy przede wszystkim anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\bullet-}$), nadtlenek wodoru (H_2O_2), rodnik hydroksylowy ($\bullet OH$), kwas chlorowy (I) (**HOCl**), kwas bromowy (I) (**HOBr**), kwas hypotiocyanowy (**HOSCN**), tlenek azotu ($\bullet NO$), ditlenek azotu ($\bullet NO_2$) oraz nadtlenoazotyn ($ONOO^-$). Powszechnie przyjmuje się, iż indywidua te biorą udział w różnorodnych procesach fizjologicznych i patofizjologicznych. Pomimo kilku dekad intensywnych badań poświęconych charakterystyce biologicznej roli **RFT** i **RFA**, ze względu na ich wysoką reaktywność i krótki czas życia w układach biologicznych, detekcja i ilościowe oszacowanie produkcji tych indywiduów w badanych układach wciąż pozostaje dużym wyzwaniem.

Dla zrozumienia roli, jaką poszczególne **RFT** i **RFA** odgrywają w procesach biologicznych potrzebna jest szczegółowa charakterystyka powstających *in vivo* produktów oksydatywnej modyfikacji różnorodnych biomolekuł – białek, kwasów nukleinowych i lipidów. Podejście takie pozwala określić częstokroć dość specyficznie, jakie indywiduum produkowane jest

w badanym układzie, nie daje jednak możliwości ilościowego monitorowania jego produkcji w funkcji czasu. Aby ten cel osiągnąć, wykorzystuje się techniki fluorescencyjne i odpowiednie luminescencyjne próbniki molekularne. [1]

W literaturze przedmiotu opisano cały szereg próbników zaprojektowanych do detekcji poszczególnych **RFT** i **RFA**. Próbniki takie, reagując z reaktywną formą tlenu, bądź reaktywną formą azotu, przekształcane są w stosunkowo trwałe, fluorescencyjne lub chemiluminescencyjne produkty, których produkcję śledzić można wykorzystując bardzo czułe techniki fluorescencyjne. W ostatnich dziesięcioleciach próbniki luminescencyjne stały się powszechnie wykorzystywanym narzędziem w badaniach biologicznych poświęconych określeniu roli jaką **RFT** i **RFA** odgrywają w różnorodnych procesach fizjologicznych i patofizjologicznych. Racjonalne wykorzystanie takich próbników wymaga jednak dobrego zrozumienia mechanizmu ich działania. Najczęściej próbniki takie przekształcane są do odpowiednich fluorescencyjnych produktów na drodze reakcji utlenienia. Dla właściwego opisu mechanizmu oksydatywnej transformacji danego próbniaka, jak i dla poprawnej interpretacji danych eksperymentalnych uzyskanych z jego wykorzystaniem, potrzebna jest dokładna charakterystyka jego reaktywności, a w wielu przypadkach również charakterystyka reaktywności powstających nietrwałych produktów pośrednich. [1, 2]

Na przestrzeni ostatnich 25 lat szczególnie wiele uwagi poświęcono charakterystyce nadtlendioazotynu. [3] Kwas nadtlendioazotawy (**ONOOH**) i anion nadtlendioazotynowy (**ONOO⁻**), będące brøstedowską parą kwas–zasada ($pK_a(\text{ONOOH}) = 6,8$), [3] są to wysoce reaktywne utleniacze powstające *in vivo* na drodze rekombinacji dwóch biologicznie istotnych rodników: anionorodnika ponadtlenkowego (**O₂^{•-}**) i tlenku azotu (**•NO**). Wspomniany proces rekombinacji jest reakcją bardzo szybką, kontrolowaną dyfuzyjnie (reakcja 1, $k_1 = 0,4\text{--}1,6 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [3] przez co wygrywa ona z innymi ścieżkami zaniku obu tych rodników (np. dysmutacją anionorodnika ponadtlenkowego katalizowaną przez dysmutazy ponadtlenkowe).



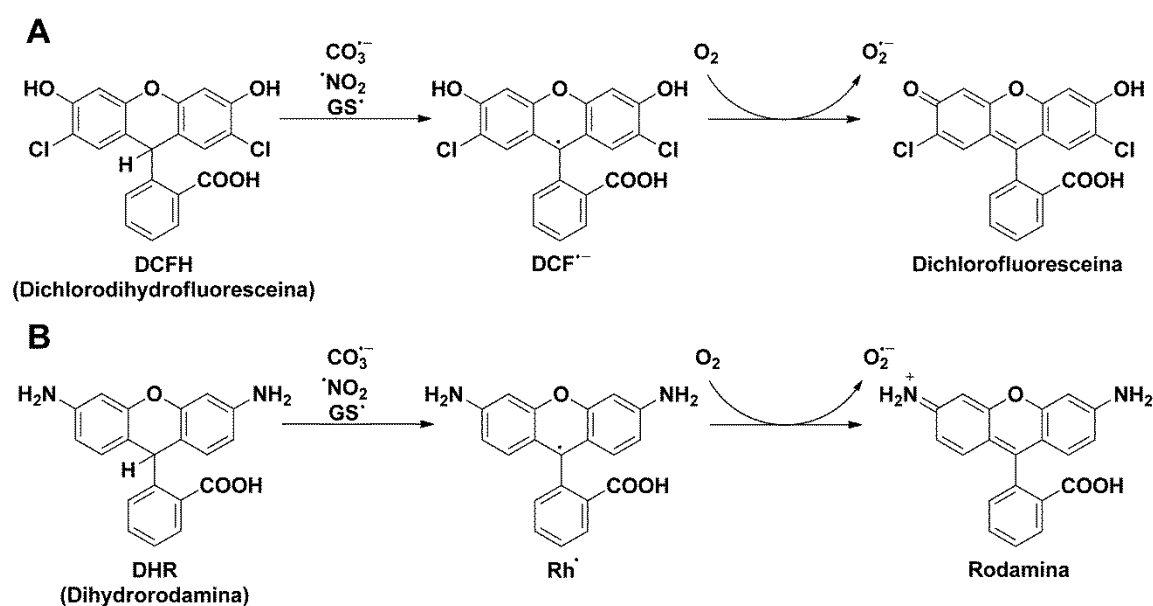
Nadtlenoazotyn jest silnym jedno- i dwuelektronowym utleniaczem ($E^\circ(\text{ONOO}^-, 2\text{H}^+/\text{•NO}_2) = 1,4 \text{ V}$ i $E^\circ(\text{ONOO}^-, 2\text{H}^+/\text{NO}_2^-) = 1,2 \text{ V}$ w pH 7). [4] Co istotne jest on również źródłem silnie utleniających rodników, które powstawać mogą bądź na drodze homolitycznego zerwania wiązania **O-O** w cząsteczce **ONOOH** (reakcja 2, $k_2 = 0,9 \text{ s}^{-1}$

dla pH 7,4 i 37°C), [5] bądź na drodze reakcji anionu **ONOO⁻** z ditlenkiem węgla (reakcja 4, $k_4 = 5,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, 37°C). [6] Równolegle z reakcją, w której powstają rodniki **•NO₂** i **•OH** (reakcja 2), zachodzi reakcja izomeryzacji kwasu **ONOOH** do kwasu azotowego (V) (reakcja 3).



Powstający w reakcji 4, niestabilny anion nitrozonadtlenowęglanowy (**ONOOCO₂⁻**) rozkłada się do ditlenku azotu (**•NO₂**) i anionorodnika węglanowego (**CO₃^{•-}**) (reakcja 5, $\eta = 35\%$ początkowej ilości **ONOOCO₂⁻**) lub do azotanu (V) i ditlenku węgla (reakcja 6, $\eta = 65\%$ początkowej ilości **ONOOCO₂⁻**). [6] Reakcje 2 i 5 prowadzą do powstawania silnych jednoelektronowych utleniaczy: rodnika hydroksylowego (**•OH**), ditlenku azotu (**•NO₂**) oraz anionorodnika węglanowego (**CO₃^{•-}**). [7]

Przez wiele lat metody detekcji nadtlenoazotynu opierały się na reakcji utleniania odpowiednich fluorescencjogennych próbników, będących zredukowanymi barwnikami fluorescencyjnymi, przez wspomniane rodniki **CO₃^{•-}**, **•NO₂** i **•OH**, których źródłem jest nadtlenoazotyn. Do próbników takich należą dichlorodihydrofluoresceina (**DCFH**) i dihydrorodamina (**DHR**) (schemat 1). [8]



Schemat 1. Mechanizm jednoelektronowego utleniania (A) DCFH i (B) DHR.

Oba te próbники w reakcji ze wspomnianymi jednoelektronowymi utleniaczami ulegają przekształceniu do fluorescencyjnych produktów (odpowiednio dichlorofluoresceiny i rodminy) w szeregu następczych i równoległych reakcji rodnikowych. Co ważne, detekcja **RFT** i **RFA** z wykorzystaniem wspomnianych próbników **DCFH** i **DHR** jest niespecyficzna, gdyż reakcja tych próbników z wszelkimi jednoelektronowymi utleniaczami (np. rodnikami glutationyłowymi **GS[•]**) prowadzi do powstawania takich samych fluorescencyjnych produktów. [9] Ponadto pokazano, iż rodnikowe produkty jednoelektronowego utleniania tych próbników (**DCF^{•-}** i **Rh[•]**, schemat 1) reagują z tlenem cząsteczkowym, co prowadzi do powstawania anionorodnika ponadtlenkowego. [9, 10] Wszystko to powoduje, że próbники te w zasadzie nie nadają się do specyficznej detekcji nadtlenoazotynu. Z tego też powodu jeszcze pod koniec pierwszej dekady XXI wieku istniało duże zapotrzebowanie na próbники fluorescencyjne przeznaczone do detekcji **ONOO⁻**, które reagowałby bezpośrednio z nadtlenoazotynem, nie zaś z pochodzącymi od niego rodnikami **[•]NO₂** i **CO₃^{•-}**, dając w tej reakcji, o ile to możliwe, specyficzne produkty.

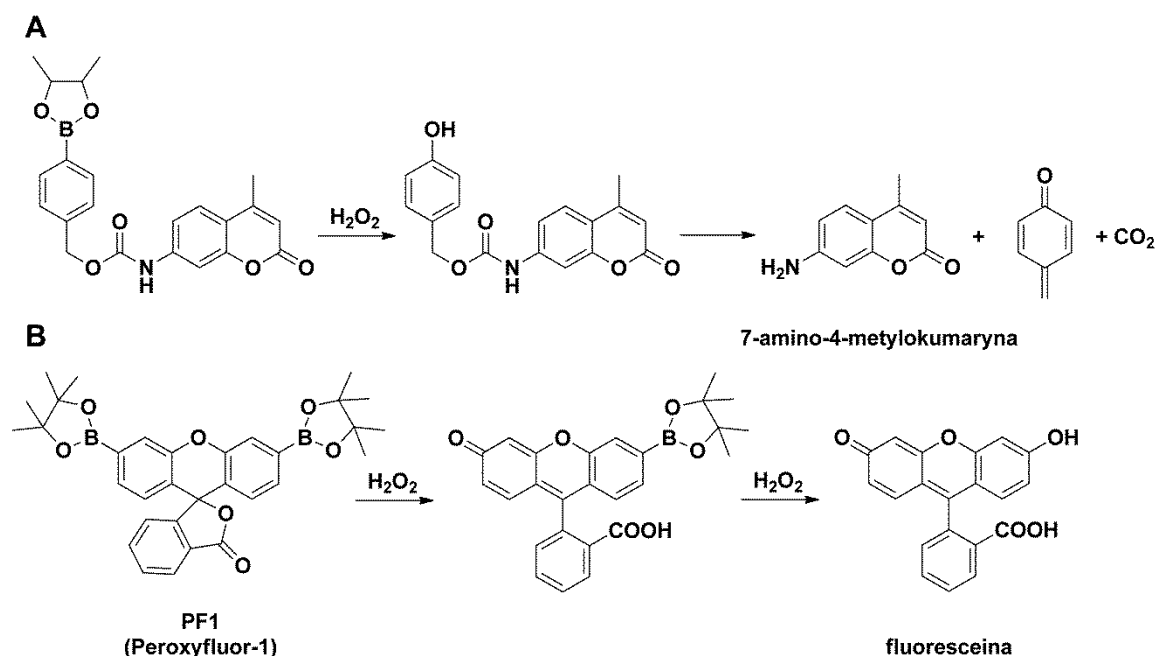
Opis celu naukowego i wyników omawianego cyklu artykułów naukowych

Cykl publikacji naukowych, wybranych przeze mnie jako podstawa niniejszej rozprawy habilitacyjnej, poświęcony jest przede wszystkim opisaniu mechanistycznych aspektów oksydatywnej transformacji kwasów boronowych, w tym fluorescencyjnych próbników boronowych, jak również próbника Amplex Red, w kontekście ich wykorzystania do detekcji nadtlenku wodoru i/lub nadtlenoazotynu. Kolejne publikacje naukowe prezentują wykorzystanie fluorescencyjnych próbników boronowych w badaniach reaktywności azanonu (**HNO**) lub jego donorów.

W artykule [H1] przedstawiliśmy wyniki badań kinetyki i mechanizmu utleniania wybranych związków boronowych przez nadtlenek wodoru, chloran (I) i nadtlenoazotyn w wodnych roztworach o pH 7,4.

W połowie pierwszej dekady XXI wieku w literaturze przedmiotu opisano nową klasę fluorescencyjnych próbników przeznaczonych do detekcji nadtlenku wodoru w układach biologicznych. Zaproponowana metoda opierała się na utlenianiu boronowych pochodnych barwników fluorescencyjnych przez **H₂O₂** do macierzystych barwników. Pierwszym fluorescencyjnym próbniakiem boronowym zaprojektowanym do detekcji **H₂O₂** była pochodna 7-amino-4-metylokumaryny, uwalniająca ten fluorescencyjny związek w reakcji z **H₂O₂**

(schemat 2A). [11] W roku 2004 Chang i współpracownicy opisali syntezę i własności diboronowej pochodnej fluoresceiny Peroxyfluor-1 (**PF1**) (schemat 2B). [12] W reakcji z nadtlenkiem wodoru ten słabo fluorescencyjny związek przekształcany jest do silnie fluorescencyjnej fluoresceiny.



Schemat 2. Reakcje utleniania pierwszych fluorescencyjnych boronowych próbników zaprojektowanych do detekcji H_2O_2 : (A) 4-boronobenzyloksykarbonylowej pochodnej 7-amino-4-metylokumaryny, (B) próbника Peroxyfluor-1 (**PF1**).

W obydwu tych artykułach ich autorzy opisywali zsyntezowane związki boronowe, jako selektywne względem nadtlenku wodoru, ignorując fakt, iż analiza dostępnej wówczas literatury naukowej, dotyczącej reakcji utleniania związków boronowych jasno wskazywała, iż związki te mogą być utleniane do fenoli przez szereg różnych utleniaczy. Przykładowo – utlenianie kwasów fenyloboronowych do fenoli przez kwas chlorowy (I) i kwas bromowy (I) opisane zostało już w roku 1962. [13] Analiza dostępnej literatury pozwoliła nam przypuszczać, iż związki boronowe powinny być z łatwością utleniane do odpowiednich fenoli przez kwas chlorowy (I) a także przez szereg różnych reaktywnych form tlenu i azotu, posiadających w swej strukturze grupę wodoronadtlenkową. Wiedzeni takimi przesłankami postanowiliśmy zbadać reaktywność prostych związków boronowych względem nadtlenoazotynu i porównać ich reaktywność względem nadtlenoazotynu, nadtlenku wodoru i kwasu chlorowego (I).

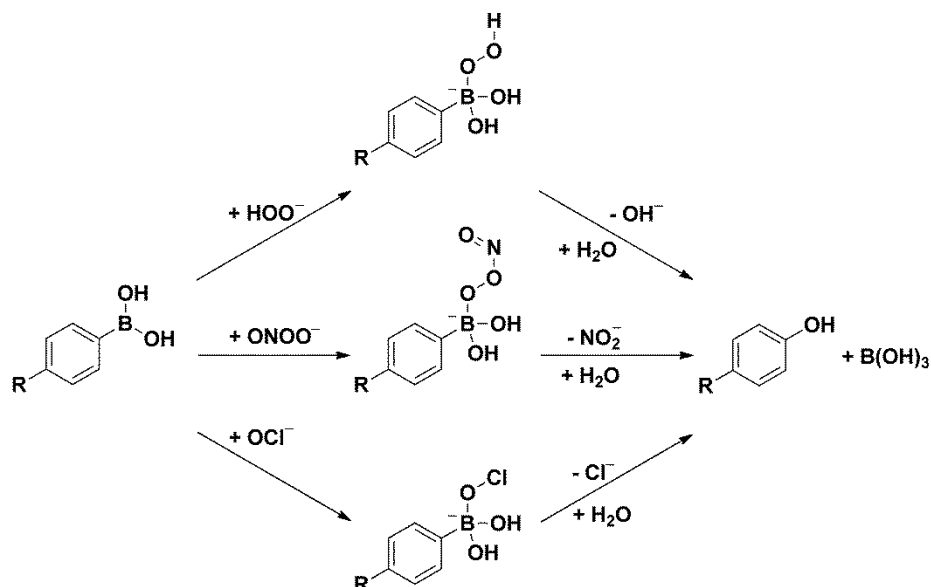
Kwasy i estry boronowe są to związki organiczne posiadające w swej strukturze trójiwiązalny atom boru w hybrydyzacji sp^2 podstawiony alkilowym lub arylowym podstawnikiem i dwoma grupami hydroksylowymi lub estrowymi. Obecność w strukturze tych związków atomu boru z pustym orbitalem p sprawia, iż są one kwasami Lewisa. Wartość pK_a większości kwasów boronowych mieści się w zakresie od 6 do 9, w zależności od charakteru powiązanego z atomem boru podstawnika organicznego. [14] To właśnie możliwość nukleofilowej addycji anionowych nadtlenków do grupy boronowej znacząco ułatwia utlenianie. Nie bez znaczenia jest również fakt, iż wiązanie węgiel–bor należy do wiązań słabych. Dzięki obu tym cechom związki boronowe okazały się dobrymi próbnikami do detekcji nadtlenoazotynu i innych **RFT** i **RFA**. Warto w tym miejscu zaznaczyć, iż utlenianie związków fenyloboronowych do fenoli nadtlenkiem wodoru w środowisku zasadowym opisane zostało w literaturze naukowej przeszło 80 lat temu. [15]

W pracy [H1] pokazaliśmy, że nadtlenoazotyn utlenia związki boronowe do odpowiednich fenoli w bezpośredniej i szybkiej reakcji. Wyzaczyliśmy wartości odpowiednich stałych szybkości reakcji związków boronowych z nadtlenoazotynem ($k \sim 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), kwasem chlorowym (I) ($k \sim 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) i nadtlenkiem wodoru ($k \sim 1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) w wodnych roztworach o pH 7,4, co jasno pokazuje, że nadtlenoazotyn reaguje w tych warunkach z kwasami boronowymi milion razy szybciej, niż nadtlenek wodoru i około 100 razy szybciej niż kwas chlorowy (I). Ze względu na wysoką reaktywność związków boronowych względem nadtlenoazotynu, wskazaliśmy na możliwość wykorzystania fluorescencyjnych próbników boronowych do detekcji nadtlenoazotynu w układach komórkowych.

Na podstawie miareczkowania związków boronowych wymienionymi utleniaczami i przeprowadzonej analizy konsumpcji substratu i wydajności powstawania odpowiedniego fenolu ustaliliśmy, że stechiometria tych reakcji wynosi 1:1, przy czym wydajność powstawania fenolu w reakcji związku boronowego z nadtlenoazotynem wynosi około 80–85%, zaś dla innych utleniaczy (H_2O_2 i HOCl) jest bliska 100%. Dokładna analiza HPLC mieszanin reakcyjnych wskazała również na możliwość powstawania w reakcji związków boronowych z ONOO^- rodnikowych produktów pośrednich (z wydajnością szacowaną na 15–20%).

Na podstawie przeprowadzonych badań zaproponowaliśmy ogólny mechanizm utleniania związków boronowych przez wymienione utleniacze. W pierwszym etapie tych reakcji

powstaje odpowiedni addukt anionu **ONOO⁻**, **OCI⁻** lub **HOO⁻** do grupy boronowej, który następnie rozkłada się do odpowiedniego produktu fenolowego (schemat 3).



Schemat 3. Proponowany mechanizm utleniania związków boronowych przez nadtlenek wodoru, nadtlenoazotyn i kwas chlorowy (I).

Obserwowane różnice w wartościach stałych szybkości reakcji utleniania związków boronowych przez wymienione utleniacze w wodnych roztworach o pH 7,4 można częściowo wytłumaczyć, zgodnie z zaproponowanym mechanizmem, różnicami w wartościach pK_a odpowiednich form kwasowych. Dla **H₂O₂**, **HOCl** i **ONOOH** wartości pK_a wynoszą odpowiednio 11,7, 7,47 i 6,7 zatem w pH równym 7,4 udział formy anionowej, utleniającej związek boronowy wynosi 0,005% dla nadtlenu wodoru, 46% dla kwasu chlorowego (I) i 83% dla nadtlenoazotynu.

W pracy [H1] pokazaliśmy również, że ani tlenek azotu ani anionorodnik ponadtlenkowy, generowane osobno, nie są w stanie utlenić związków boronowych do odpowiednich fenoli, co ma miejsce, gdy są generowane jednocześnie (co oczywiście skutkuje powstawaniem w badanym układzie nadtlenoazotynu). Pokazaliśmy także, że ditlenek azotu nie utlenia związków boronowych do fenoli.

Wydajność oksydatywnej konwersji związku boronowego do odpowiedniego fenolu dla reakcji z **H₂O₂**, czy **HOCl** bliska była 100%. W przypadku reakcji z **H₂O₂** nie obserwowano powstawania żadnych dodatkowych produktów, nawet przy użyciu dużego nadmiaru utleniacza, natomiast w przypadku **HOCl** dodatkowe produkty obserwowane były tylko przy zastosowaniu jego nadmiaru. W tych warunkach powstający pierwotnie fenol ulegał

następczej reakcji z nadmiarowym **HOCl**. Jak już wspomniano, w przypadku nadtlenoazotynu obserwowana wydajność powstawania fenolu (wyznaczona dla utleniania kwasu 4-acetylofenyloboronowego) wynosiła około 85%, co wyraźnie wskazuje na istnienie drugiej ścieżki reakcji. Dostępna literatura przedmiotu, dotycząca chemii nadtlenoazotynu, pokazuje, iż addukty **ONOO⁻** do dwutlenku węgla, czy związków karbonylowych, ulegają rozkładowi do produktów na dwóch równoległych ścieżkach – rodnikowej i nierodnikowej. [16, 17] Dlatego zaproponowaliśmy, że addukt **ONOO⁻** do grupy boronowej również ulega dalszemu rozkładowi na dwóch równoległych ścieżkach – rodnikowej i nierodnikowej. Mechanizm rodnikowej ścieżki reakcji nadtlenoazotynu ze związkami boronowymi zbadany i opisany został przez nas w publikacji [H3] przedstawionej w dalszej części autoreferatu.

W pracy tej pokazaliśmy również, iż ditlenek azotu produkowany w katalizowanej przez mieloperoksydazę reakcji utleniania azotanów (III) przez nadtlenek wodoru, nie utlenia związków boronowych do odpowiednich fenoli, co pozwala wykorzystać związki boronowe do identyfikacji utleniacza odpowiedzialnego w układzie biologicznym za powstawanie 3-nitrotyrozyny, uważanej za istotny marker stresu oksydacyjnego i produkcji nadtlenoazotynu.

W pracy [H1] postawiliśmy również tezę, iż przedstawiony mechanizm reakcji związków boronowych z **ONOO⁻**, **OCI⁻** i **H₂O₂**, jak i profil ich reaktywności wyrażający się w wartościach stałych szybkości ich reakcji z tymi utleniaczami, w uogólnieniu odnosi się do całej klasy związków boronowych, w tym również do fluorescencyjnych próbników boronowych, opisanych w literaturze jako selektywne względem **H₂O₂**. Ze względu na wysoką reaktywność kwasu chlorowego (I) względem tioli, detekcja tego utleniacza z wykorzystaniem związków boronowych w takich układach wydaje się praktycznie niemożliwa.

W podsumowaniu zasugerowaliśmy, że wyniki naszych badań jasno wskazują na możliwość wykorzystania związków boronowych, jako nowej klasy próbników fluorescencyjnych do detekcji nadtlenoazotynu *in vivo* i do obrazowania jego produkcji w takich warunkach.

W kolejnym artykule ([H2]) opisaliśmy właściwości i reaktywność kwasu kumaryno-7-boronowego (**CBA**). Pokazaliśmy, że reakcja **CBA** z nadtlenoazotynem jest szybka, stechiometryczna (o stechiometrii 1:1) i prowadzi do powstawania fluorescencyjnej 7-hydroksykumaryny, jako głównego produktu ($\eta = 81\%$). Reaktywność **CBA** względem nadtlenoazotynu jest podobna jak opisana przez nas wcześniej reaktywność prostych

związków aryloboronowych ([H1]). Wykorzystując technikę zatrzymanego przepływu wyznaczyliśmy wartość stałej szybkości reakcji **CBA** z nadtlenoazotynem ($k = 1,1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

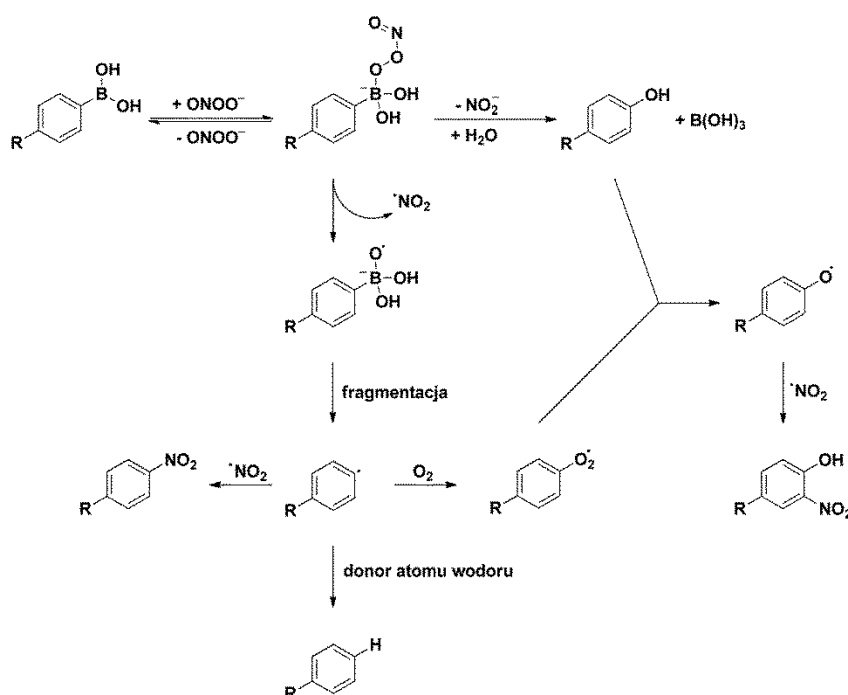
Wysoka reaktywność próbnika **CBA** względem nadtlenoazotynu sprawia, że nawet w niskich mikromolowych stężeniach w roztworach o pH 7,4 reakcja próbnika z nadtlenoazotynem jest szybsza niż rozkład nadtlenoazotynu zachodzący w tych warunkach.

W pracy tej pokazaliśmy także, że próbnik **CBA** jest efektywnie utleniany do fluorescencyjnej 7-hydroksykumaryny także w układzie, w którym nadtlenoazotyn powstaje z rekombinacji anionorodnika ponadtlenkowego i tlenu azotu, co pozwala monitorować w badanym układzie produkcję nadtlenoazotynu w czasie rzeczywistym. W eksperymencie tym zbadaliśmy również jaki wpływ na szybkość utleniania **CBA** do **COH** ma w tych warunkach dodatek **SOD** (katalizującej dysmutację anionorodnika ponadtlenkowego do H_2O_2 i O_2) oraz katalazy (katalizującej rozkład H_2O_2 do wody i O_2). Eksperyment ten pokazał, że żaden z tych enzymów, nawet jeśli obecne są w badanym układzie razem i w stosunkowo wysokich stężeniach ($c_{\text{kat}} = 100 \text{ U/ml}$, $c_{\text{SOD}} = 1 \text{ mg/ml}$), nie jest w stanie całkowicie zahamować utleniania próbnika **CBA**. Fenomen ten wyjaśnić można jeśli rozważy się konkurencję między **SOD** i $\bullet\text{NO}$ o anionorodnik ponadtlenkowy. Wyniki przeprowadzonych przez nas symulacji kinetycznych z wykorzystaniem programu *Kintecus* były zgodne z wynikami przeprowadzonego eksperymentu, dobrze odwzorowując zależność obserwowanego stopnia inhibicji utleniania **CBA** w funkcji stężenia **SOD**.

Jak już wspomniano wyżej, analiza mieszanin reakcyjnych przeprowadzona w celu określenia dla badanych reakcji utleniania związków boronowych wydajności tworzenia produktów i stechiometrii tych reakcji, przedstawiona w pracach [H1] i [H2], pokazała, że zarówno nadtlenek wodoru jak i kwas chlorowy (I) reagują ze związkami boronowymi zgodnie ze stechiometrią 1:1, dając jako jedyny produkt odpowiedni fenol ze 100% wydajnością. Natomiast w reakcji z nadtlenoazotynem, również reagującym ze związkami boronowymi zgodnie ze stechiometrią 1:1, odpowiednie fenole powstają z wydajnością szacowaną na 80–90%. Powstawanie innych, ubocznych produktów silnie wskazywało na udział drugiej, rodnikowej ścieżki reakcji, prowadzącej do powstawania rodników fenyłowych $\text{Ph}\bullet$, fenoksyłowych $\text{PhO}\bullet$ i rodników $\bullet\text{NO}_2$. Artykuł [H3] poświęcony jest badaniom mającym wyjaśnić mechanizm wspomnianej rodnikowej ścieżki reakcji związków boronowych z nadtlenoazotynem. Dla scharakteryzowania nietrwałych rodnikowych produktów pośrednich, powstających w reakcji związków boronowych z ONOO^- wykorzystaliśmy

spektroskopię elektronowego rezonansu paramagnetycznego i technikę pułapkowania spinowego. Dzięki wykorzystaniu techniki pułapkowania spinowego i dwóch różnych pułapek spinowych: 2-metylo-2-nitrozopropanu (**MNP**) i N-tlenku 5-dietoksyfosforylo-5-metylopiroliny (**DEPMPO**) udało nam się spułapkować rodniki fenyłowe, powstające w badanej reakcji. Nie udało nam się natomiast spułapkować rodników fenoksyłowych. W toku przeprowadzonych badań udało nam się ustalić, iż rodniki fenoksyłowe powstają w badanym układzie, jako wtórne nietrwałe produkty pośrednie. Analogiczne eksperymenty przeprowadzone dla reakcji utleniania związków boronowych przez nadtlenuk wodoru nie wykazały powstawania żadnych indywiduów rodnikowych, co zgodne jest z obserwowaną 100% wydajnością tworzenia produktów fenolowych.

Opierając się na poczynionych obserwacjach na przykładzie utleniania kwasów fenyloboronowych zaproponowaliśmy ogólny mechanizm reakcji tych związków z nadtlenuk azotynem (schemat 4).



Schemat 4. Mechanizm reakcji kwasów fenyloboronowych z nadtlenuk azotynem, obejmujący główną ścieżkę reakcji, prowadzącą do powstawania fenolu i ścieżkę rodnikową, prowadzącą do powstawania produktów ubocznych.

W pierwszym etapie tej reakcji zachodzi przyłączenie anionu **ONOO⁻** do elektrofilowego atomu boru grupy boronowej w cząsteczce **PhB(OH)₂**. Powstały anionowy produkt pośredni **PhB(OH)₂OONO⁻** może ulegać następnie przekształceniu do dalszych produktów na dwóch ścieżkach. Główna, nierodnikowa ścieżka, zachodząca poprzez heterolityczne zerwanie

wiązania **O-O** prowadzi ostatecznie do odpowiedniego fenolu, kwasu borowego i azotanu (III). Druga, rodnikowa ścieżka uboczna, zachodząca poprzez homolityczne zerwanie wiązania **O-O** prowadzi do powstawania nietrwałego rodnikowego produktu pośredniego **PhB(OH)₂O^{•-}** i rodnika **•NO₂**.

W zaproponowanym przez nas mechanizmie rodniki fenyłowe **Ph[•]**, których powstawanie obserwowano w eksperymentach przeprowadzonych z wykorzystaniem pułapek spinowych, powstają na drodze fragmentacji anionorodnika **PhB(OH)₂O^{•-}**, bądź też po jego uprotonowaniu, rodnika **PhB(OH)₃[•]**. Podejrzewać można, iż ten ostatni, będący formalnie adduktem rodnika fenyłowego **Ph[•]** do cząsteczki kwasu borowego **B(OH)₃**, powinien być wysoce niestabilny i ulegać spontanicznej fragmentacji. Przeprowadzone przez nas obliczenia kwantowo-mechaniczne DFT sugerują, że dysocjacja rodnika **PhB(OH)₃[•]** jest bezbarierowa, natomiast wyliczona bariera energetyczna procesu fragmentacji anionorodnika **PhB(OH)₂O^{•-}**, prowadzącego do powstawania rodników fenyłowych **Ph[•]**, jest bardzo niska, rzędu 3-4 kcal/mol. Wyniki przeprowadzonych przez nas obliczeń DFT silnie wskazują na możliwość spontanicznej fragmentacji, powstających na ścieżce rodnikowej, anionorodników **PhB(OH)₂O^{•-}** bądź rodników **PhB(OH)₃[•]**.

Rodniki fenyłowe **Ph[•]**, powstające na ścieżce rodnikowej reakcji związków boronowych z nadtlenoazotynem, przebiegającej poprzez homolityczne zerwanie wiązania **O-O** w addukcie nadtlenoazotynu do kwasu borowego **PhB(OH)₂OONO⁻** i dalszą fragmentację anionorodnika **PhB(OH)₂O^{•-}** mogą następnie ulegać w roztworze szeregu reakcjom. Jedną z możliwych jest szybka reakcja z tlenem cząsteczkowym prowadząca do powstawania silnie utleniających rodników fenyloperoksyłowych **PhOO[•]**. Rodniki te zdolne są utleniać powstające na głównej, nierodnikowej ścieżce fenole do odpowiednich rodników fenoksyłowych **PhO[•]**, a z nich powstawać mogą odpowiednie specyficzne dla tych rodników produkty końcowe – nitrofenole i produkty dimeryzacji.

Powstające rodniki fenyłowe **Ph[•]** są dobrymi akceptorami atomu wodoru i z łatwością mogą odrywać go od szeregu związków będących jego donorami, w tym alkoholi (np. 2-propanolu), tioli itp. Wreszcie, powstające rodniki fenyłowe **Ph[•]** mogą reagować z utworzonymi na tej samej ścieżce reakcji rodnikami ditlenku azotu (**•NO₂**), co prowadzi do powstawania odpowiednich nitropochodnych **PhNO₂**.

W efekcie, końcowe i trwałe produkty powstające w reakcji utleniania związków boronowych przez nadtlenoazotyn mają specyficzny dla tego utleniacza profil, który

traktować można jak jego „odcisk palca”. Ten specyficzny dla nadtlendioazotynu profil produktów może być wykorzystany do jego identyfikacji (jak zostanie to pokazane przy omawianiu artykułu [H5]), gdyż inne utleniacze np. H_2O_2 czy HOCl nie tworzą w reakcji utleniania związków boronowych odpowiednich produktów rodnikowych.

W artykule [H4] przedstawiliśmy charakterystykę trzech prostych, izomerycznych kwasów fenyloboronowych połączonych kowalencyjnie z kationową grupą tryfenylofosfoniową. Przyłączenie do danego związku chemicznego kationowej grupy tryfenylofosfoniowej jest często wykorzystywaną strategią, zapewniającą akumulację powstałego kationu w obrębie mitochondriów. Stąd badane przez nas kwasy fenyloboronowe zostały zaprojektowane jako molekularne próbники dedykowane do detekcji reaktywnych form tlenu i azotu (**RFTiA**) w mitochondriach.

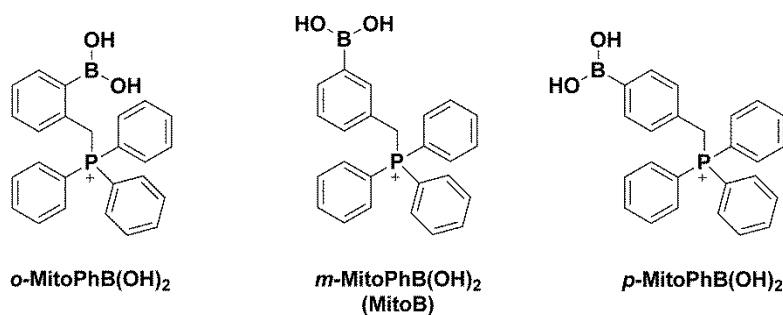
Mitochondria uważane są za jedno z głównych źródeł **RFT** w komórkach, przez co są jednocześnie tymi organellami komórkowymi, które są najbardziej narażone na utleniające działanie **RFTiA**. Powszechnie uważa się, że anionorodnik ponadtlenkowy, będący produktem jednoelektronowej redukcji tlenu cząsteczkowego, jest w mitochondriach produktem ubocznym oddychania tlenowego. Jego dysmutacja (spontaniczna, bądź katalizowana przez **SOD**) prowadzi do powstawania H_2O_2 , zaś jego reakcja z tlenkiem azotu prowadzi do powstawania nadtlendioazotynu. Powstawanie nadtlendioazotynu w obrębie mitochondriów wydaje się prawdopodobne, jako że $\bullet\text{NO}$ może z łatwością przedyfundować do ich wnętrza.

Pierwszy celowany do mitochondriów próbnik boronowy **MitoPY1** opisany został w literaturze przedmiotu przez Changa i współpracowników w roku 2008. [18] Związek **MitoPY1** jest boronową pochodną barwnika fluorescencyjnego, będącego hybrydą fluoresceiny i rodaminy, połączoną poprzez odpowiednio dobrany linker z grupą tryfenylofosfoniową, zapewniającą jego akumulację w obrębie mitochondriów.

Inny próbnik boronowy do detekcji nadtlenu wodoru w obrębie mitochondriów został zaprojektowany, zsyntezowany i opisany przez Murphy’ego i współpracowników. Związek ten, będący bromkiem (3-boronobenzylo)tryfenylofosfoniowym, nazwany przez autorów **MitoB**, użyty został do pomiarów mitochondrialnej produkcji nadtlenu wodoru *in vivo* w muszkach owocowych. [19, 20] Pomiar ten opierał się na założeniu, że po podaniu do organizmu muszki owocowej **MitoB**, kation tej soli akumuluje się w obrębie mitochondriów, gdzie jest utleniany do odpowiedniego fenolu (**MitoP**) przez produkowany w mitochondriach nadtlenek wodoru. Natężenie produkcji nadtlenu wodoru wyrażane jest

na podstawie pomiaru ilości **MitoB** i **MitoP**, jako stosunek **MitoP/MitoB**, co pozwala dokonać korekcji na zmiany w dystrybucji próbnika i produktu jego utlenienia.

Zainspirowani przez prof. Murphy'ego (od niego otrzymaliśmy niewielką próbkę związku **MitoB**), w artykule [H4] zajęliśmy się charakterystyką reakcji **MitoB** (*m*-MitoPhB(OH)₂) i dwóch jego izomerów (*o*-MitoPhB(OH)₂ i *p*-MitoPhB(OH)₂) z nadtlenoazotynem. Związki *o*-MitoPhB(OH)₂ i *p*-MitoPhB(OH)₂ włączyliśmy do badań by sprawdzić, czy położenie dużej i kationowej grupy tryfenylofosfoniowej względem grupy boronowej wpływa na kinetykę i mechanizm reakcji utleniania przez **ONOO⁻**.



Rysunek 1. Struktury kationów trzech izomerycznych próbników boronowych celowanych do mitochondriów, opisanych w pracy [H4].

Na potrzeby badań zsyntezowaliśmy trzy izomeryczne, celowane do mitochondriów, próbniiki aryloboronowe: *p*-MitoPhB(OH)₂, *m*-MitoPhB(OH)₂ (**MitoB**) i *o*-MitoPhB(OH)₂ (rysunek 1), jak również spodziewane specyficzne dla reakcji z **ONOO⁻** produkty: **MitoPh** i *o*-, *m*- oraz *p*-MitoPhNO₂.

W badaniach kinetycznych reakcji próbników **MitoPhB(OH)₂** z nadtlenoazotynem skorzystaliśmy z metody reakcji konkurencyjnych oraz zsyntezowanej przez nas boronowej pochodnej rezorufiny **PC1**, dla której w badaniach bezpośrednich wyznaczyliśmy wartość stałej szybkości reakcji z nadtlenoazotynem [$k = (1,0 \pm 0,1) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$]. W badaniach kinetycznych nadtlenoazotyn generowaliśmy radiacyjnie z wykorzystaniem techniki radiolizy impulsowej. Podobnie jak inne związki boronowe, również badane przez nas izomeryczne próbniiki **MitoPhB(OH)₂** reagują z nadtlenoazotynem w roztworach o pH 7,4 z wysokimi stałymi szybkości reakcji: $(3,5 \pm 0,5) \times 10^5$, $(1,0 \pm 0,1) \times 10^6$, i $(1,0 \pm 0,1) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, odpowiednio dla izomeru *orto*, *meta* i *para*.

Ustaliliśmy również, iż w przypadku wszystkich trzech izomerów w reakcji z nadtlenoazotynem oprócz odpowiednich fenoli, będących głównymi produktami utleniania

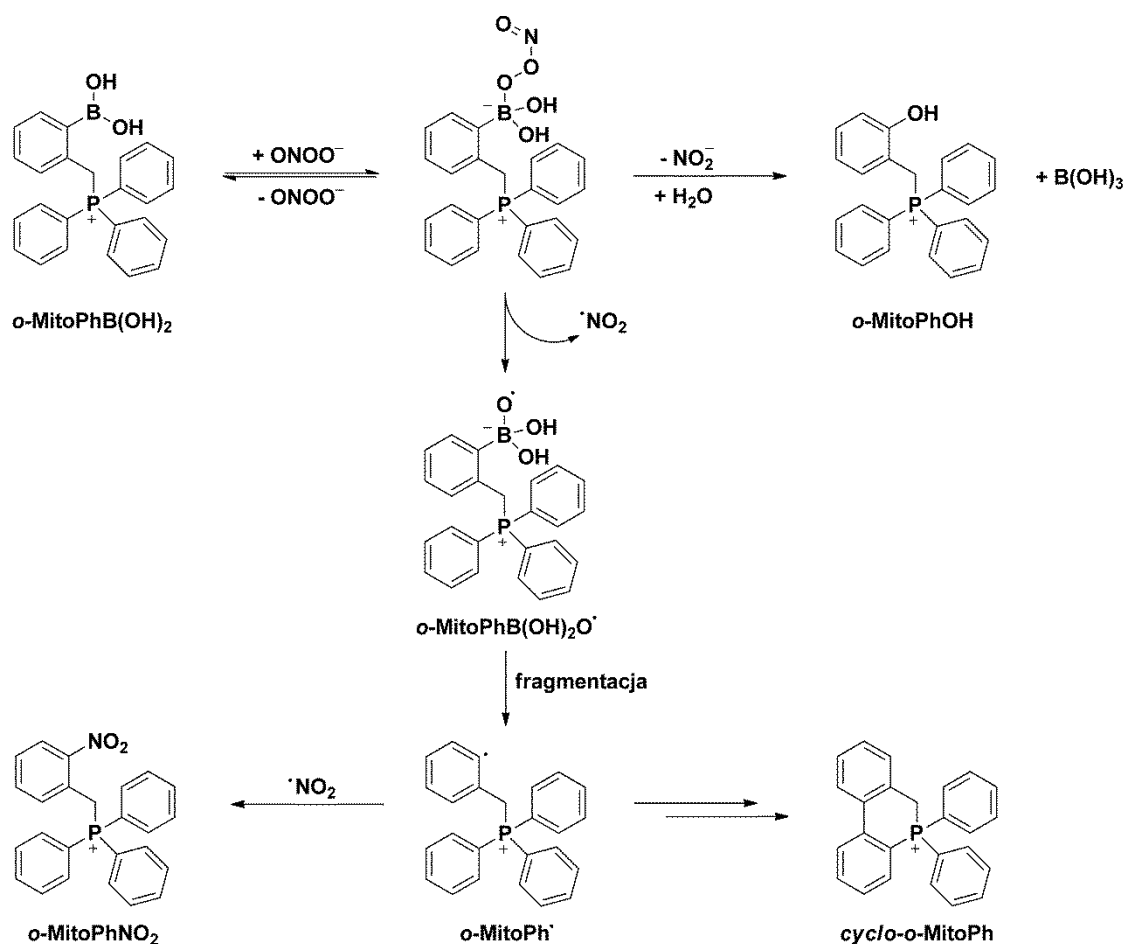
wymienionych próbników, powstają również produkty uboczne typowe dla ścieżki rodnikowej opisanej w [H3]: **MitoPh**, *o*-, *m*- i *p*-**MitoPhNO₂**.

Aby scharakteryzować nietrwałe, rodnikowe produkty pośrednie powstające w reakcji nadtlendioazotynu z badanymi próbnikami boronowymi, wykorzystaliśmy spektroskopię elektronowego rezonansu paramagnetycznego oraz technikę pułapkowania spinowego. W eksperymentach przeprowadzonych z wykorzystaniem pułapek spinowych **MNP** i **DEPMPO** udało nam się spułapkować rodniki fenyłowe *m*-**MitoPh[•]** i *p*-**MitoPh[•]** powstające na drodze reakcji **ONOO⁻** odpowiednio z *m*-**MitoPhB(OH)₂** i *p*-**MitoPhB(OH)₂**. Dla próbniaka *o*-**MitoPhB(OH)₂** nie zarejestrowaliśmy żadnych sygnałów, które można by przypisać odpowiednim adduktom rodnika *o*-**MitoPh[•]** do użytych pułapek spinowych.

Wykorzystując technikę HPLC, zbadaliśmy również profil produktów powstających w reakcji badanych próbników boronowych z nadtlendioazotynem, stosując w badanych układach dodatek 2-propanolu, jako zmiatacza rodników fenyłowych. Przeprowadzone analizy HPLC pokazały, że głównymi produktami utleniania próbników **MitoPhB(OH)₂** przez nadtlendioazotyn, w przypadku wszystkich trzech izomerów, są odpowiednie fenole **MitoPhOH** (powstające z wydajnością około 90%). Badane izomery znacząco jednak różniły się wydajnością produktów powstających na ścieżce rodnikowej. W przypadku izomerów *para* i *meta*, w obecności 10% objętościowych 2-propanolu (**2-PrOH**), jako zmiatacza rodników fenyłowych, głównym trwałym produktem powstającym na rodnikowej ścieżce reakcji badanego próbniaka z nadtlendioazotynem był **MitoPh**, powstający przez oderwanie atomu wodoru od **2-PrOH** przez rodniki **MitoPh[•]**. W przypadku izomeru *orto* wydajność **MitoPh** była znacząco niższa. Głównym produktem powstającym na ścieżce rodnikowej, oznaczonym na podstawie analizy HPLC poprzez porównanie ze zsyntezowanym standardem, był w tym przypadku *o*-**MitoPhNO₂**.

Przeprowadzone przez nas obliczenia kwantowo-mechaniczne DFT sugerowały, iż bariera energetyczna fragmentacji anionorodnika *o*-**MitoPhB(OH)₂O^{•-}** może być znacząco niższa niż odpowiednia bariera fragmentacji anionorodników *m*-**MitoPhB(OH)₂O^{•-}** i *p*-**MitoPhB(OH)₂O^{•-}**. W artykule [H4] zaproponowaliśmy spontaniczną i szybką fragmentację anionorodnika *o*-**MitoPhB(OH)₂O^{•-}** z następczą reakcją rekombinacji rodników *o*-**MitoPh[•]** i **•NO₂**, zachodzącą w klatce rozpuszczalnika i prowadzącą do powstawania *o*-**MitoPhNO₂**. Nasze późniejsze szczegółowe analizy produktów utlenienia próbniaka *o*-**MitoPhB(OH)₂**, przeprowadzone z wykorzystaniem aparatu LC-MS/MS, pokazały iż rodnik fenyłowy *o*-**MitoPh[•]**, będący nietrwałym

produktem pośrednim badanej reakcji ulega szybkiej wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji, dając jako ostateczny trwały produkt kation 9,10-dihydro-9,9-difenylo-9-fosfonofenantreniowy, nazwany przez nas **cyclo-o-MitoPh** (wyniki tych badań zaprezentowane zostały w pracy [B13]). Zaznaczyć należy, iż produkt ten jest oczywiście specyficzny dla reakcji próbnika **o-MitoPhB(OH)₂** z nadtlenoazotynem (wyznaczona wydajność jego powstawania w tej reakcji wynosi $10,5 \pm 0,5\%$, zaś wydajność powstawania **o-MitoPhNO₂** $0,5 \pm 0,1\%$). Zbiórny mechanizm utleniania próbnika **o-MitoPhB(OH)₂** przez nadtlenoazotyn przedstawia schemat 5.



Schemat 5. Mechanizm reakcji próbnika **o-MitoPhB(OH)₂** z nadtlenoazotynem, obejmujący główną ścieżkę reakcji, prowadzącą do powstawania fenolu **o-MitoPhOH** i ścieżkę rodnikową, prowadzącą do powstawania specyficznego dla nadtlenoazotynu produktu **cyclo-o-MitoPh**.

Podobnie jak w przypadku prostych kwasów fenyloboronowych, addukt ONOO^- do elektrofilowego atomu boru w grupie boronowej ulega przekształceniu do produktów na dwóch ścieżkach. Główna wiedzie poprzez heterolityczne zerwanie wiązania O-O do fenolu

i azotanu (III), uboczna poprzez rozkład homolityczny do anionorodnika **MitoPhB(OH)₂O^{•-}** (a dalej rodnika fenylowego **MitoPh[•]**) i ditlenku azotu **•NO₂**.

Przeprowadzona analiza ilości produktów powstających w reakcji nadtlendioazotynu z badanymi próbnikami **MitoPhB(OH)₂** pozwoliła nam również porównać kinetykę obu procesów – rodnikowego i nierodnikowego. Stosunek stałych szybkości obu tych ścieżek reakcji $k_{\text{rad}}/k_{\text{nonrad}}$ można określić na podstawie zależności sumy stężeń produktów powstających na ścieżce rodnikowej od stężenia głównego produktu utleniania. Dla izomerów *meta* i *para* stosunek ten wynosi odpowiednio 0,1 i 0,07.

W kolejnym artykule [H5], włączonym przeze mnie do omawianego tutaj cyklu, skoncentrowaliśmy się na próbie określenia chemicznej natury produktu reakcji **HNO** z tlenem cząsteczkowym w wodnych roztworach o pH 7,4. **HNO**, w literaturze przedmiotu powszechnie określany jako nitroksyl (ang. *nitroxyl*) (angielska nazwa zalecana przez IUPAC to *azanone*, stąd w niniejszej rozprawie używać będę nazwy azanon, będącej spolszczeniem nazwy zalecanej), formalnie jest uprotonowanym produktem jednoelektronowej redukcji tlenku azotu. Ta reaktywna, trzyatomowa cząsteczka wciąż pozostaje najbardziej zagadkową i najslabiej poznaną reaktywną formą azotu a jej chemiczna reaktywność i własności biologiczne wciąż czekają na zbadanie i opisanie.

Podstawowy stan elektronowy **HNO** jest stanem singletowym, natomiast podstawowy stan elektronowy formy anionowej (**NO⁻**), będącej indywiduum chemicznym izoelektronowym z cząsteczką tlenu **O₂**, jest stanem trypletowym. W konsekwencji deprotonacja **HNO** jest procesem spinowo wzbronionym, przez co jest to proces raczej powolny (wyznaczona stała szybkości reakcji **HNO** z jonami **OH⁻** ma wartość $4,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a **HNO** jest bardzo słabym kwasem ($\text{pK}_a \sim 11,4$)). [21]

Jednym z bardzo ciekawych aspektów reaktywności **HNO** i **NO⁻** jest ich reakcja z tlenem cząsteczkowym. Anion **NO⁻** jako indywiduum trypletowe reaguje z tlenem cząsteczkowym (również znajdującym się w stanie trypletowym) niezwykle szybko ($k = 2,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), [21] dając jako produkt anion nadtlendioazotynowy (reakcja 7). [21, 22]



W przypadku reakcji **HNO** z tlenem cząsteczkowym, zachodzącej w wodnych roztworach o pH 7,4, chemiczna tożsamość powstającego produktu, posiadającego właściwości utleniające, przez wiele lat była przedmiotem sporu – jedni autorzy sugerowali,

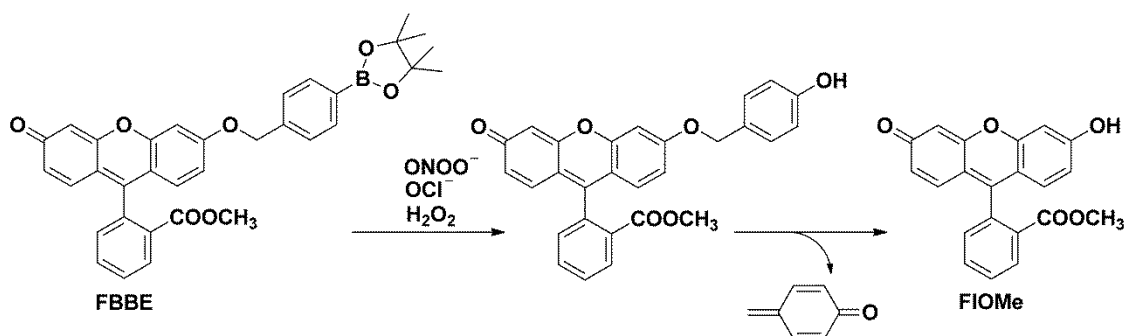
iż utleniaczem tym jest nadtlenoazotyn, inni temu przeczyli. [23–25] W rezultacie chemiczna tożsamość utleniacza powstającego w tej prostej reakcji utleniania niewielkiej trójątomowej cząsteczki przez wiele lat pozostawała nieokreślona, co wynikało przede wszystkim z braku odpowiednich próbników reagujących z nadtlenoazotynem z utworzeniem produktów specyficznych dla tego utleniacza. W artykule [H5] przedstawiliśmy niepodważalne dowody na to, że produktem reakcji **HNO** z tlenem cząsteczkowym w roztworze buforowym o pH 7,4 jest nadtlenoazotyn. Było to możliwe dzięki wykorzystaniu opracowanych przez nas wcześniej metod detekcji tego indywiduum, opartych na użyciu próbników boronowych, reagujących z nadtlenoazotynem z utworzeniem szeregu produktów specyficznych dla tego utleniacza. W tym celu wykorzystaliśmy próbnik **CBA** (wstępnie scharakteryzowany w pracy [H2]) i pokazaliśmy, że w reakcji z nadtlenoazotynem oprócz głównego produktu utlenienia 7-hydroksykumaryny [**COH**, $\eta = (82,7 \pm 0,3)\%$] powstają również kumaryna [**CH**, $\eta = (15,3 \pm 0,2)\%$] i 7-nitrokumaryna [**CNO₂**, $\eta = (2,0 \pm 0,1)\%$]. W roztworach soli Angeliego, będącej donorem **HNO**, **CBA** przekształcane jest do tych samych produktów powstających w bardzo zbliżonych proporcjach: **COH** [$\eta = (83,8 \pm 0,2)\%$], **CH** [$\eta = (14,4 \pm 0,2)\%$] i **CNO₂**, [$\eta = (1,8 \pm 0,2)\%$].

W artykule [H5] wykorzystaliśmy również metodę reakcji konkurencyjnych oraz zestaw zmiataczy azanonu o znanej reaktywności do wyznaczenia wartości stałej szybkości reakcji **HNO** z **O₂**. Wyznaczona przez nas wartość tej stałej dla reakcji biegnącej w roztworze wodnym o pH 7,4 w temperaturze 25°C wynosi $(1,8 \pm 0,3) \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Wartość ta jest około dwukrotnie wyższa od wartości oszacowanej wcześniej przez Liocheva i Fridovicha ($k = 8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [26] i sześciokrotnie wyższa od wartości wyznaczonej przez Mirandę i współpracowników ($k = 3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). [27]

Wspomnianą pracę ([H5]) uważam za ważną z dwóch powodów – udało nam się określić w niej chemiczną tożsamość produktu powstającego w reakcji **HNO** z **O₂** w wodnych roztworach o pH 7,4, pokazując że jest to nadtlenoazotyn, oraz opracować prostą metodę służącą do badania kinetyki reakcji **HNO**. We wspomnianej pracy metodę tę wykorzystaliśmy do zbadania reaktywności **HNO** względem szeregu tioli a także jonów **HS⁻**. Wyznaczyliśmy wartości stałych szybkości dla reakcji **HNO** z cysteiną [$(4,5 \pm 0,9) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$], glutationem [$(3,1 \pm 0,6) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$], ditiotreitolem [$(2,8 \pm 0,7) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$], N-acetylocysteiną [$(1,4 \pm 0,3) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$], kaptoprilem [$(0,6 \pm 0,1) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$], surowiczą albuminą wołową (**BSA**) i ludzką (**HSA**) [$(1,4 \pm 0,4) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$], a także jonami **HS⁻** [$(1,2 \pm 0,3) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$].

Ta wysoka reaktywność **HNO** względem tioli sprawia, iż w układach biologicznych są one prawdopodobnie głównymi jego zmiataczami zaś reakcja **HNO** z tlenem, prowadząca do powstawania nadtlenoazotynu, ma marginalne znaczenie jeśli wziąć pod uwagę względnie niskie stężenie tlenu *in vivo*.

Przy projektowaniu próbników fluorescencyjnych do detekcji reaktywnych form tlenu i azotu pod kątem ich zastosowania w układach biologicznych istotnym zagadnieniem jest odpowiedni dobór fluoroforu, tak by wzbudzenie i emisja powstającego w reakcji z **RFTiA** reportera fluorescencyjnego przypadły na zakres spektralny, w którym nie absorbują składniki komórkowe. Z tego względu w kolejnym artykule ([**H6**]) skupiliśmy się na syntezie i charakterystyce próbniaka boronowego opartego na fluoroforze fluoresceinowym. Artykuł [**H6**] koncentruje się na charakterystyce 4-boronobenzylowej pochodnej estru metylowego fluoresceiny (**FBBE**). Mechanizm jego oksydatywnej konwersji do estru metylowego fluoresceiny (**FIOMe**) przedstawia poniższy schemat (schemat 6).



Schemat 6. Mechanizm utleniania fluorescencyjnego próbniaka **FBBE** do estru metylowego fluoresceiny (**FIOMe**) przez nadtlenek wodoru, chloran (I) i nadtlenoazotyn.

We wspomnianej pracy zbadaliśmy reaktywność **FBBE** względem nadtlenoazotynu, kwasu chlorowego (I), nadtlenku wodoru a także wodoronadtlenku tyrozyny (**TyrOOH**) i pokazaliśmy, że wszystkie te związki zdolne są utleniać **FBBE** do **FIOMe**. Dla reakcji próbniaka **FBBE** z nadtlenoazotynem, kwasem chlorowym (I) i nadtlenkiem wodoru wyznaczyliśmy wartości drugorzędowych stałych szybkości reakcji, które dla wodnych roztworów o pH 7,4 w temperaturze 25°C wynoszą odpowiednio $(2,8 \pm 0,2) \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $(8,6 \pm 0,5) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ i $(0,96 \pm 0,03) \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Dla wybranych reaktywnych form tlenu i azotu zbadaliśmy również wpływ glutationu (**GSH**) na oksydacyjną konwersję próbniaka **FBBE** do **FIOMe**. Pokazaliśmy, że glutation całkowicie blokuje utlenianie **FBBE** przez **HOCl**, znacząco hamuje utlenianie **FBBE** przez

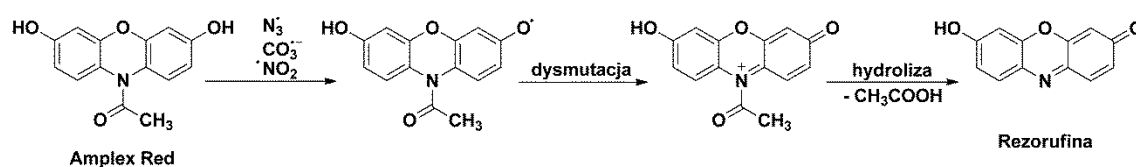
Aby wykazać użyteczność próbnika **FBBE** do detekcji nadtlendioazotynu w układach biologicznych, zbadaliśmy utlenianie tego próbnika w hodowli ludzkich komórek śródbłonka naczyńowego **Ea.hy926** stymulowanych do produkcji **RFTiA** doksorubicyną. Pokazaliśmy, że inkubacja komórek **Ea.hy926** z doksorubicyną prowadzi do oksydatywnej transformacji próbnika **FBBE**, skutkującej wzrostem intensywności fluorescencji, który jest inhibitowany przez **L-NAME** (będący inhibitorem syntazy tlenku azotu) i **PEG-SOD**, lecz nie **PEG-katalazę**, co sugeruje udział nadtlendioazotynu w utlenianiu **FBBE**.

Chemical reaction scheme showing the conversion of Amplex Red to Rezorufina:

Amplex Red (10-acetylo-3,7-dihydroxyphenoxazine) reacts with HRP and H_2O_2 to form Rezorufina (resorufin).

30

W artykule [H7] przedstawiliśmy charakterystykę spektroskopową produktów jednoelektronowego utleniania Amplex Red, przeprowadzoną z wykorzystaniem techniki radiolizy impulsowej. Scharakteryzowaliśmy również nietrwały produkt pośredni powstający na drodze dysmutacji rodnikowych produktów utlenienia i pokazaliśmy, że związek ten ulega spontanicznej hydrolizie do fluorescencyjnej rezorufiny (schemat 8). Celem przeprowadzonych przez nas badań było nakreślenie potencjalnego mechanizmu oksydatywnej konwersji próbника Amplex Red w układzie **HRP/H₂O₂**, przy założeniu, że związek ten w wymienionym układzie w pierwszym etapie ulega jednoelektronowemu utlenieniu. W toku przeprowadzonych badań określiliśmy również reaktywność tego próbника względem wybranych utleniaczy jednoelektronowych. Wyniki przeprowadzonych przez nas badań pokazały, że jednoelektronowe utlenianie próbника Amplex Red prowadzi na drodze następnych reakcji do powstawania rezorufiny, jako produktu końcowego (schemat 8).



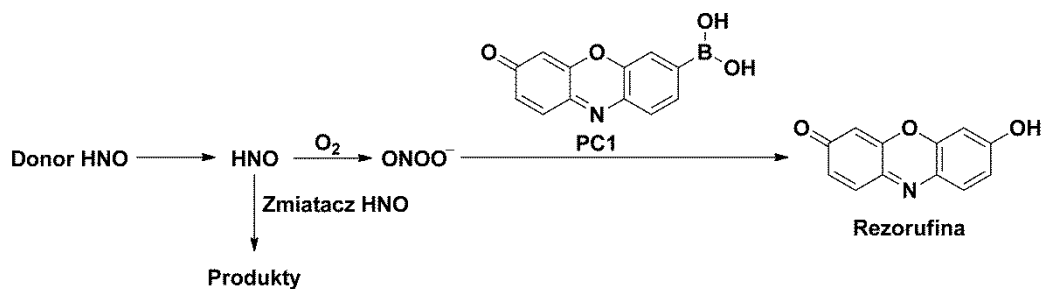
Schemat 8. Proponowany mechanizm oksydatywnej konwersji próbника Amplex Red do rezorufiny po jednoelektronowym utlenieniu.

Pokazaliśmy również, że anionorodnik węglanowy ($\text{CO}_3^{\bullet-}$), będący silnym jednoelektronowym utleniaczem, którego prekursorem w układach biologicznych może być nadtlenoazotyn, zdolny jest utleniać dianion Amplex Red w pH 10,3 z wysoką stałą szybkości reakcji [$k = (7,6 \pm 0,3) \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$].

Zbadaliśmy również reaktywność Amplex Red względem rodników azydowych ($\text{N}_3^{\bullet}$) i wyznaczyliśmy wartość stałej szybkości reakcji utleniania tego związku przez wspomniane rodniki ($k = 2,1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pH 7,2). Ponieważ standardowy potencjał jednoelektronowej redukcji rodnika $\text{N}_3^{\bullet}$ jest około 0,3 V niższy niż standardowy potencjał jednoelektronowej redukcji anionorodnika $\text{CO}_3^{\bullet-}$, przypuszczać można, że anionorodnik $\text{CO}_3^{\bullet-}$ również w roztworach obojętnych powinien być zdolny utlenić Amplex Red a odpowiednia stała szybkości reakcji powinna mieć wysoką wartość. Na podstawie przeprowadzonych badań oszacowaliśmy również wartość standardowego potencjału jednoelektronowej redukcji rodnika Amplex Red w roztworach wodnych o pH 7,2, otrzymując wartość 1,14 V.

W artykule [H7] wykazaliśmy również, że nadtlendioazotyn zdolny jest utleniać Amplex Red do rezorufiny, przy czym za utlenianie to odpowiedzialne są silnie utleniające rodniki powstające z rozkładu nadtlendioazotynu lub też rozkładu produktu jego reakcji z CO_2 . Co ważne, pokazaliśmy również, że nadtlendioazotyn może utleniać Amplex Red w reakcji katalizowanej przez **HRP**, co stawia pod znakiem zapytania selektywność testu Amplex Red/**HRP**. Wyniki naszych eksperymentów jasno pokazują, że wyniki uzyskane z wykorzystaniem testu Amplex Red/**HRP** mogą zawyżać ilość oznaczanego H_2O_2 jeśli w układzie produkowany jest również nadtlendioazotyn. W artykule tym zasugerowaliśmy również, by dla właściwej identyfikacji utleniacza wykorzystywanego przez **HRP** do utleniania Amplex Red stosować odpowiednie kontrole – dodatek katalazy w celu usunięcia z układu H_2O_2 i związku boronowego w celu usunięcia z układu ONOO^- , co powinno umożliwić oszacowanie udziału obu tych utleniaczy w obserwowanym sygnale.

Artykuł [H8] poświęcony jest badaniom kinetycznym reaktywności azanonu (**HNO**). W przeprowadzonych badaniach wyznaczyliśmy wartości stałych szybkości reakcji **HNO** z dość dużą grupą jego zmiataczy. W badaniach tych wykorzystaliśmy metodę reakcji konkurencyjnych, opisaną przez nas uprzednio w artykule [H5]. W metodzie tej azanon generowany jest w badanym układzie z rozkładu odpowiedniego donora (w przeprowadzonych badaniach jako donory **HNO** wykorzystaliśmy sól Angeliego i 2-bromo-*N*-hydroksybenzenosulfonamid (**2-BrPA**)) i ulega reakcji z tlenem cząsteczkowym [$k = (1,8 \pm 0,3) \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$], co prowadzi do powstawania nadtlendioazotynu, który z łatwością wykryć można z wykorzystaniem odpowiedniego próbnika boronowego (w badaniach wykorzystaliśmy boronowy próbnik **PC1**, utleniany przez nadtlendioazotyn do fluorescencyjnej rezorufiny). W obecności badanego zmiatacza **HNO**, zmiatacz ten konkuruje z obecnym w roztworze tlenem o azanon, w wyniku czego powstają mniejsze ilości nadtlendioazotynu i obserwuje się spowolnienie szybkości utleniania wykorzystanego próbnika. Odpowiedni model reakcji ilustrujący badany przez nas układ przedstawia schemat 9. **HNO** uwalniany jest z soli Angeliego (3 μM) lub **2-BrPA** (3 μM), ulega reakcji z obecnym w roztworze zmiataczem lub z tlenem cząsteczkowym (225 μM), w której to reakcji powstaje nadtlendioazotyn, utleniający próbnik **PC1** do fluorescencyjnej rezorufiny.



Schemat 9. Układ reakcji konkurencyjnych wykorzystany w badaniach kinetyki reakcji HNO z jego zmiataczami.

Dzięki badaniom przeprowadzonym na przestrzeni ostatnich dwudziestu lat, dziś znacznie lepiej rozumiemy chemię i biologię azanonu, wciąż jednak jest to jedna z najłabiej poznanych reaktywnych form azotu. Nie znamy np. odpowiedzi na bardzo ważne pytanie – czy **HNO** powstaje *in vivo*? Kinetyka reakcji **HNO** również nie została dotychczas należycie scharakteryzowana, głównie ze względu na brak odpowiednich metod badawczych.

W artykule [H8] wyznaczyliśmy wartości stałych szybkości reakcji **HNO** z azotanem (III) ($k = (5,0 \pm 0,9) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), hydroksylaminą ($k = (2,1 \pm 0,4) \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), siarczanem (IV) ($k = (1,2 \pm 0,2) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), tiosiarczanem ($k = (2,2 \pm 0,7) \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), benzenosulfinianem ($k = (4,4 \pm 0,9) \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), 2-bromobenzenosulfinianem ($k = (5,0 \pm 1,2) \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), S-nitrozoglutationem ($k = (2,4 \pm 0,7) \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), nitrozobenzenem ($k > 1,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), 2-nitrozo-1-naftolem ($k = (1,0 \pm 0,2) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), trifenylfosfiną ($k > 7,3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), trifenylfosfino-3,3',3''-trisulfonianem ($k = (3,0 \pm 0,5) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), tris-karboksyetylofosfiną ($k = (1,2 \pm 0,3) \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Zbadaliśmy również reaktywność dwóch fluorescencyjnych próbników – trifenylfosfinowego próbniaka **P-CM** ($k > 1,2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), oraz próbniaka **TEMPO-9-AC**, posiadającego w swej strukturze rodnik nitroksylowy ($k = (9 \pm 2) \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Dla porównania wyznaczyliśmy również wartość drugorzędowej stałej szybkości reakcji **HNO** z rodnikiem nitroksylowym, 4-acetamido-**TEMPO** ($k = (8 \pm 2) \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

Artykuł [H9] jest obszernym przeglądem literaturowym poświęconym omówieniu związków celowanych do mitochondriów (ang. *mitochondria-targeted compounds*). Przedstawione są w nim zarówno najczęściej wykorzystywane strategie syntetyczne, jak i różnorakie próbniaki molekularne przeznaczone m.in. do detekcji **RFTiA** w mitochondriach oraz wybrane związki aktywne biologicznie celowane do mitochondriów.

Mitochondria uznawane są obecnie za jeden z obiecujących celów terapii przeciwnowotworowych, terapii chorób układu krążenia i chorób neurodegeneracyjnych, jak

również za jedno z głównych źródeł reaktywnych form tlenu w komórce i jednocześnie za to organelum komórkowe, które jest najbardziej narażone na szkodliwe działanie **RFTiA**.

W omawianym przeglądzie literaturowym, do którego przygotowałem obszerną część poświęconą m.in. próbnikom dedykowanym do detekcji **RFTiA** w obrębie mitochondriów, podsumowaliśmy literaturę naukową poświęconą badaniom małowcząsteczkowych związków celowanych do mitochondriów. Omówione zostały fizykochemiczne podstawy akumulacji lipofilowych kationów w obrębie mitochondriów, wykorzystywane strategie syntetyczne, próbniki celowane do mitochondriów oraz przykłady celowanych do mitochondriów związków aktywnych biologicznie. Podsumowano również opisane w literaturze związki celowane do mitochondriów zsyntezowane pod kątem ich potencjalnego wykorzystania w terapii przeciwnowotworowej.

Artykuł [**H10**] jest przeglądem literaturowym przygotowanym pod moim kierunkiem do specjalnego wydania czasopisma *Free Radical Biology and Medicine*, zatytułowanego *Current fluorescence and chemiluminescence approaches in free radical and redox biology*. W przeglądzie tym podjęliśmy się podsumowania literatury naukowej poświęconej próbnikom fluorescencyjnym dedykowanym detekcji azanonu (**HNO**). Pomimo dekady intensywnych badań poświęconych rozwojowi metod wykrywania tego indywiduum, jego detekcja *in vivo* wciąż pozostaje prawdziwym wyzwaniem. W przeglądzie tym skupiliśmy się na wyzwaniach jakie stawia detekcja **HNO**, ograniczeniach opracowanych dotychczas metod i perspektywach selektywnej detekcji **HNO** w układach biologicznych.

W artykule [**H11**], zamykającym prezentowany przez mnie cykl artykułów naukowych mojego współautorstwa, pokazaliśmy w jaki sposób próbniiki boronowe mogą być wykorzystane do charakterystyki donorów **HNO**. W artykule tym scharakteryzowano trzy donory **HNO** z grupy pochodnych kwasu Piloty'ego: 2-bromo-, 2-chloro- i 2-trifluorometylo-N-hydroksybenzenosulfonamid (odpowiednio **2-BrPA**, **2-ClPA** i **2-CF₃PA**). W badaniach kinetycznych wykorzystano boronową pochodną rezorufiny **PC1**. W artykule tym wyznaczono wartości stałych szybkości uwalniania **HNO** z badanych donorów i pokazano, że kinetyka ta silnie zależy od pH roztworu, co z kolei posłużyło do oszacowania wartości pK_a badanych związków. Na podstawie zależności stałych szybkości reakcji uwalniania **HNO** od temperatury wyznaczono odpowiednie wartości energii aktywacji procesu rozkładu badanych donorów. Dla poprawienia rozpuszczalności **2-BrPA** w wodzie przygotowaliśmy odpowiedni kompleks inkluzyjny tego związku z pochodną β -cyklodextryny i pokazaliśmy, że kinetyka rozkładu tego

donora w takim kompleksie jedynie nieznacznie różni się od kinetyki rozkładu w samym roztworze buforowym. Zbadaliśmy również zdolność tak przygotowanego kompleksu do hamowania agregacji płytek krwi a otrzymane wyniki porównaliśmy z własnościami soli Angeliego (donoru **HNO** o zbliżonej kinetyce uwalniania **HNO**).

Cytowana literatura z pominięciem prac wylistowanych jako dotychczasowy dorobek habilitanta:

- [1] P. Wardman, *Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects*, Free Radic. Biol. Med. **43** (2007) 995–1022.
- [2] B. Kalyanaraman, V. Darley-USmar, K.J. Davies, P.A. Dennerly, H.J. Forman, M.B. Grisham, G.E. Mann, K. Moore, L.J. Roberts, 2nd, H. Ischiropoulos, *Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations*, Free Radic. Biol. Med. **52** (2012) 1–6.
- [3] G. Ferrer-Sueta, N. Campolo, M. Trujillo, S. Bartsaghi, S. Carballal, N. Romero, B. Alvarez, R. Radi, *Biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration*, Chem. Rev. **118** (2018) 1338–1408.
- [4] W.H. Koppenol, J.J. Moreno, W.A. Pryor, H. Ischiropoulos, J.S. Beckman, *Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide*, Chem. Res. Toxicol. **5** (1992) 834–42.
- [5] J.S. Beckman, T.W. Beckman, J. Chen, P.A. Marshall, B.A. Freeman, *Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide*, PNAS **87** (1990) 1620–4.
- [6] A. Denicola, B.A. Freeman, M. Trujillo, R. Radi, *Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations*, Arch. Biochem. Biophys. **333** (1996) 49–58.
- [7] O. Augusto, M.G. Bonini, A.M. Amanso, E. Linares, C.C. Santos, S.L. De Menezes, *Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology*, Free Radic. Biol. Med. **32** (2002) 841–59.
- [8] M. Wrona, K. Patel, P. Wardman, *Reactivity of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 and their oxidized forms toward carbonate, nitrogen dioxide, and hydroxyl radicals*, Free Radic. Biol. Med. **38** (2005) 262–270.
- [9] M. Wrona, K.B. Patel, P. Wardman, *The roles of thiol-derived radicals in the use of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein as a probe for oxidative stress*, Free Radic. Biol. Med. **44** (2008) 56–62.
- [10] L.K. Folkes, K.B. Patel, P. Wardman, M. Wrona, *Kinetics of reaction of nitrogen dioxide with dihydrorhodamine and the reaction of the dihydrorhodamine radical with oxygen: implications for quantifying peroxynitrite formation in cells*, Arch. Biochem. Biophys. **484** (2009) 122–6.
- [11] L.C. Lo, C.Y. Chu, *Development of highly selective and sensitive probes for hydrogen peroxide*, Chem. Comm. (2003) 2728–9.
- [12] M.C. Chang, A. Pralle, E.Y. Isacoff, C.J. Chang, *A selective, cell-permeable optical probe for hydrogen peroxide in living cells*, J. Am. Chem. Soc. **126** (2004) 15392–3.

- [13] H.G. Kuivila, L.E. Benjamin, C.J. Murphy, A.D. Price, J.H. Polevy, *Electrophilic displacement reactions. XIV. Two novel reactions involving areneboronic acids and halogens*, J. Org. Chem. **27** (1962) 825–829.
- [14] *Boronic acids: preparation and applications in organic synthesis, medicine and materials*, Edited by D.G. Hall, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2005
- [15] A.D. Ainley, F. Challenger, *Studies of the boron-carbon linkage. Part I. The oxidation and nitration of phenylboric acid*, J. Chem. Soc. (1930) 2171–2180.
- [16] R.M. Uppu, G.W. Winston, W.A. Pryor, *Reactions of peroxyxynitrite with aldehydes as probes for the reactive intermediates responsible for biological nitration*, Chem. Res. Toxicol. **10** (1997) 1331–7.
- [17] G. Merenyi, J. Lind, S. Goldstein, *The rate of homolysis of adducts of peroxyxynitrite to the C=O double bond*, J. Am. Chem. Soc. **124** (2002) 40–8.
- [18] B.C. Dickinson, C.J. Chang, *A targetable fluorescent probe for imaging hydrogen peroxide in the mitochondria of living cells*, J. Am. Chem. Soc. **130** (2008) 9638–9.
- [19] H.M. Cocheme, C. Quin, S.J. McQuaker, F. Cabreiro, A. Logan, T.A. Prime, I. Abakumova, J.V. Patel, I.M. Fearnley, A.M. James, C.M. Porteous, R.A. Smith, S. Saeed, J.E. Carre, M. Singer, D. Gems, R.C. Hartley, L. Partridge, M.P. Murphy, *Measurement of H₂O₂ within living Drosophila during aging using a ratiometric mass spectrometry probe targeted to the mitochondrial matrix*, Cell Metab. **13** (2011) 340–50.
- [20] H.M. Cocheme, A. Logan, T.A. Prime, I. Abakumova, C. Quin, S.J. McQuaker, J.V. Patel, I.M. Fearnley, A.M. James, C.M. Porteous, R.A. Smith, R.C. Hartley, L. Partridge, M.P. Murphy, *Using the mitochondria-targeted ratiometric mass spectrometry probe MitoB to measure H₂O₂ in living Drosophila*, Nat. Protoc. **7** (2012) 946–58.
- [21] V. Shafirovich, S.V. Lymar, *Nitroxyl and its anion in aqueous solutions: spin states, protic equilibria, and reactivities toward oxygen and nitric oxide*, PNAS **99** (2002) 7340–5.
- [22] C.E. Donald, M.N. Hughes, J.M. Thompson, F.T. Bonner, *Photolysis of the nitrogen-nitrogen double bond in trioxodinitrate: reaction between triplet oxonitrate(1-) and molecular oxygen to form peroxyxynitrite*, Inorg. Chem. **25** (1986) 2676–2677.
- [23] K.M. Miranda, M.G. Espey, K. Yamada, M. Krishna, N. Ludwick, S. Kim, D. Jourdain, M.B. Grisham, M. Feelisch, J.M. Fukuto, D.A. Wink, *Unique oxidative mechanisms for the reactive nitrogen oxide species, nitroxyl anion*, J. Biol. Chem. **276** (2001) 1720–7.
- [24] M. Kirsch, H. de Groot, *Formation of peroxyxynitrite from reaction of nitroxyl anion with molecular oxygen*, J. Biol. Chem. **277** (2002) 13379–88.
- [25] K.M. Miranda, K. Yamada, M.G. Espey, D.D. Thomas, W. DeGraff, J.B. Mitchell, M.C. Krishna, C.A. Colton, D.A. Wink, *Further evidence for distinct reactive intermediates from nitroxyl and peroxyxynitrite: effects of buffer composition on the chemistry of Angeli's salt and synthetic peroxyxynitrite*, Arch. Biochem. Biophys. **401** (2002) 134–44.

[26] S.I. Liochev, I. Fridovich, *The mode of decomposition of Angeli's salt ($\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_3$) and the effects thereon of oxygen, nitrite, superoxide dismutase, and glutathione*, Free Radic. Biol. Med. **34** (2003) 1399–404.

[27] K.M. Miranda, N. Paolocci, T. Katori, D.D. Thomas, E. Ford, M.D. Bartberger, M.G. Espey, D.A. Kass, M. Feelisch, J.M. Fukuto, D.A. Wink, *A biochemical rationale for the discrete behavior of nitroxyl and nitric oxide in the cardiovascular system*, PNAS **100** (2003) 9196–201.

15.02.2019r.

Asikora

6. Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze

6.1. Spis pozostałych publikacji naukowych

A. Prace opublikowane przed osiągnięciem stopnia naukowego doktora

A1. 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. **163** (2004) 373–379. $\text{IF}_{2004} = 2,235$, wkład własny = 10%, liczba cytowań: 11

Mój wkład polegał na współwykonaniu części eksperymentów przeprowadzonych z wykorzystaniem techniki radiolizy niskotemperaturowych szkliv organicznych.

A2. M. Czerwinska, A. Sikora, P. Szajerski, J. Adamus, A. Marcinek, J. Gębicki, P. Bednarek, *Mechanistic aspects of alloxan diabetogenic activity: a key role of keto-enol inversion of dialuric acid on ionization*, J. Phys. Chem. A **110** (2006) 7272–8. $\text{IF}_{2006} = 3,047$, wkład własny = 15%, liczba cytowań: 6

Mój wkład polegał na współwykonaniu części eksperymentów przeprowadzonych z wykorzystaniem techniki radiolizy niskotemperaturowych szkliv organicznych.

A3. M. Czerwinska, 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. **71** (2006) 5312–9. $\text{IF}_{2006} = 3,790$, wkład własny = 15%, liczba cytowań: 14

Mój wkład polegał na współwykonaniu części eksperymentów przeprowadzonych z wykorzystaniem techniki radiolizy niskotemperaturowych szkliv organicznych.

A4. P. Szajerski, J. Zielonka, A. Sikora, J. Adamus, A. Marcinek, J. Gębicki, V.I. Kozlovski, L. Drelicharz, S. Chłopicki, *Radical scavenging and NO-releasing properties of selected beta-adrenoreceptor antagonists*, Free Radic. Res. **40** (2006) 741–52. IF₂₀₀₆ = **2,536**, wkład własny = **10%**, liczba cytowań: **10**

Mój wkład polegał na wykonaniu części eksperymentów przeprowadzonych z wykorzystaniem techniki radiolizy impulsowej.

A5. K. Piech, T. Bally, A. Sikora, A. Marcinek, *Mechanistic aspects of the oxidative and reductive fragmentation of N-nitrosoamines: a new method for generating nitrenium cations, amide anions, and aminyl radicals*, J. Am. Chem. Soc. **129** (2007) 3211–7. IF₂₀₀₇ = **7,885**, wkład własny = **15%**, liczba cytowań: **17**

Mój wkład polegał na współwykonaniu części obliczeń kwantowo-mechanicznych, dyskusji wyników a także na korekcie artykułu przed złożeniem manuskryptu.

A6. A. Sikora, J. Adamus, A. Marcinek, *Disproportionation of clozapine radical: a link between one-electron oxidation of clozapine and formation of its nitrenium cation*, Chem. Res. Toxicol. **20** (2007) 1093–8. IF₂₀₀₇ = **3,508**, wkład własny = **60%**, liczba cytowań: **15**

Mój wkład polegał na opracowaniu ogólnej koncepcji badań, zaprojektowaniu i przeprowadzeniu większości eksperymentów, analizie danych, dyskusji wyników i udziale w przygotowaniu manuskryptu.

B. Prace opublikowane po osiągnięciu stopnia naukowego doktora

B1. A. Sikora, P. Szajerski, Ł. Piotrowski, J. Zielonka, J. Adamus, A. Marcinek, J. Gębicki, *Radical scavenging properties of nicotinamide and its metabolites*, Rad. Phys. Chem. **77** (2008) 259–266. IF₂₀₀₈ = **0.882**, wkład własny = **50%**, liczba cytowań: **6**

Mój wkład polegał na wykonaniu części eksperymentów przeprowadzonych z wykorzystaniem techniki radiolizy impulsowej.

B2. H. Zhang, J. Zielonka, A. Sikora, J. Joseph, Y. Xu, B. Kalyanaraman, *The effect of neighboring methionine residue on tyrosine nitration and oxidation in peptides treated with MPO, H₂O₂, and NO₂(-) or peroxynitrite and bicarbonate: role of intramolecular electron*

transfer mechanism?, Arch. Biochem. Biophys. **484** (2009) 134–45. IF₂₀₀₉ = **3,046**, wkład własny = **15%**, liczba cytowań: **17**

Mój wkład polegał na współwykonaniu części eksperymentów, analizie danych i dyskusji wyników a także na udziale w przygotowaniu manuskryptu.

B3. A. Błoch-Mechkour, T. Bally, A. Sikora, R. Michalski, A. Marcinek, J. Gębicki, *Radicals and radical ions derived from indole, indole-3-carbinol and diindolylmethane*, J. Phys. Chem. A **114** (2010) 6787–94. IF₂₀₁₀ = **2,732**, wkład własny = **15%**, liczba cytowań: **6**

Mój wkład polegał na współwykonaniu eksperymentów przeprowadzonych z wykorzystaniem radiolizy impulsowej i radiolizy niskotemperaturowych szklów organicznych, analizie danych i dyskusji wyników.

B4. R. Michalski, A. Sikora, J. Adamus, A. Marcinek, *Dihalide and pseudohalide radical anions as oxidizing agents in nonaqueous solvents*, J. Phys. Chem. A **114** (2010) 861–6. IF₂₀₁₀ = **2,732**, wkład własny = **25%**, liczba cytowań: **16**

Mój wkład polegał na opracowaniu ogólnej koncepcji badań i współwykonaniu części eksperymentów przeprowadzonych z wykorzystaniem radiolizy impulsowej i radiolizy niskotemperaturowych szklów organicznych, analizie danych i dyskusji wyników.

B5. R. Michalski, A. Sikora, J. Adamus, A. Marcinek, *Mechanistic aspects of radiation-induced oligomerization of 3,4-ethylenedioxythiophene in ionic liquids*, J. Phys. Chem. A **114** (2010) 11552–9. IF₂₀₁₀ = **2,732**, wkład własny = **25%**, liczba cytowań: **2**

Mój wkład polegał na opracowaniu ogólnej koncepcji badań i współwykonaniu części eksperymentów przeprowadzonych z wykorzystaniem radiolizy niskotemperaturowych szklów organicznych, analizie danych i dyskusji wyników.

B6. J. Zielonka, A. Sikora, J. Joseph, B. Kalyanaraman, *Reply to Jourdeuil: Peroxynitrite is the major species formed from different flux ratios of co-generated nitric oxide and superoxide*, J. Biol. Chem. **285** (2010) 1e16. IF₂₀₁₀ = **5,328**, wkład własny = **30%**, liczba cytowań: **2**

Mój wkład polegał na konsultacji treści tej odpowiedzi i korekcie artykułu przed złożeniem manuskryptu.

B7. J. Zielonka, A. Sikora, M. Hardy, J. Joseph, B. P. Dranka, B. Kalyanaraman, *Boronate probes as diagnostic tools for real time monitoring of peroxyxynitrite and hydroperoxides*, Chem. Res. Toxicol. **25** (2012) 1793–9. IF₂₀₁₂ = **3,667**, wkład własny = **15%**, liczba cytowań: **99**

Mój wkład polegał na konsultacji treści tego artykułu przeglądowego i korekcie przed złożeniem manuskryptu.

B8. 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. **287** (2012) 2984–95.

IF₂₀₁₂ = **4.651**, wkład własny = **15%**, liczba cytowań: **95**

Mój wkład polegał na konsultacjach naukowych treści tego artykułu, dyskusji wyników i korekcie artykułu przed złożeniem manuskryptu.

B9. J. Zielonka, J. Joseph, A. Sikora, B. Kalyanaraman, *Real-time monitoring of reactive oxygen and nitrogen species in a multiwell plate using the diagnostic marker products of specific probes*, Methods Enzymol. **526** (2013) 145–57. IF₂₀₁₃ = **2,194**, wkład własny = **20%**, liczba cytowań: **15**

Mój wkład polegał na konsultacjach naukowych treści tego artykułu, dyskusji wyników i korekcie artykułu przed złożeniem manuskryptu.

B10. M. Jakubowska, J. Adamus, J. Gębicki, A. Marcinek, A. Sikora, *Pulse radiolysis and spectrophotometric studies on the binding of organic cations with heparin*, Rad. Phys. Chem. **99** (2014) 6–11. IF₂₀₁₄ = **1,380**, wkład własny = **30%**, liczba cytowań: **5**

Mój wkład polegał na opracowaniu ogólnej koncepcji badań, analizie i dyskusji wyników oraz opracowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.

B11. R. Michalski, B. Michałowski, 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. **67** (2014) 278–84. IF₂₀₁₄ = **5,736**, wkład własny = **10%**, liczba cytowań: **26**

Mój wkład polegał na konsultacjach naukowych koncepcji pracy, dyskusji wyników i korekcie artykułu przed złożeniem manuskryptu.

B12. J. Zielonka, A. Sikora, J. Adamus, B. Kalyanaraman, *Detection and differentiation between peroxynitrite and hydroperoxides using mitochondria-targeted arylboronic acid*, Methods Mol. Biol. **1264** (2015) 171–81, wkład własny = **20%**, liczba cytowań: **9**

Mój wkład polegał na konsultacjach naukowych koncepcji pracy, dyskusji wyników i korekcie artykułu przed złożeniem manuskryptu.

B13. J. Zielonka, M. Zielonka, L. VerPlank, G. Cheng, M. Hardy, O. Ouari, M. M. Ayhan, R. Podsiadły, A. Sikora, J. D. Lambeth, B. Kalyanaraman, *Mitigation of NADPH Oxidase 2 Activity as a Strategy to Inhibit Peroxynitrite Formation*, J. Biol. Chem. **291** (2016) 7029–44. **IF₂₀₁₆ = 4.125**, wkład własny = **10%**, liczba cytowań: **28**

Mój wkład polegał na konsultacjach naukowych, dyskusji wyników i korekcie artykułu przed złożeniem manuskryptu.

B14. K. Dębowska, D. Dębski, M. Hardy, M. Jakubowska, B. Kalyanaraman, A. Marcinek, R. Michalski, B. Michałowski, O. Ouari, A. Sikora, R. Smulik, J. Zielonka, *Toward selective detection of reactive oxygen and nitrogen species with the use of fluorogenic probes – Limitations, progress, and perspectives*, Pharmacol. Rep. **67** (2015) 756–64. **IF₂₀₁₅ = 2,251**, wkład własny = **20%**, liczba cytowań: **24**

Mój wkład polegał na opracowaniu ogólnej koncepcji tej pracy, przygotowaniu jej części dotyczącej wykorzystanie próbników boronowych do detekcji nadtlendioazotynu oraz opracowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.

B15. B. Kalyanaraman, G. Cheng, M. Hardy, O. Ouari, A. Sikora, J. Zielonka, M. Dwinell, *Mitochondria-targeted metformins: anti-tumor and redox signalling mechanisms*, Interface Focus **7** (2017) 20160109. **IF₂₀₁₇ = 3,165**, wkład własny = **10%**, liczba cytowań: **4**

Mój wkład polegał na konsultacjach naukowych, dyskusji wyników i korekcie artykułu przed złożeniem manuskryptu.

B16. B. Kalyanaraman, G. Cheng, M. Hardy, O. Ouari, A. Sikora, J. Zielonka, M. B. Dwinell, *Modified metformin as a more potent anticancer drug: mitochondrial inhibition, redox signaling, antiproliferative effects and future EPR studies*, Cell Biochem. Biophys. **75** (2017) 311–317. **IF₂₀₁₇ = 1,455**, wkład własny = **10%**, liczba cytowań: **6**

Mój wkład polegał na konsultacjach naukowych, dyskusji wyników i korekcie artykułu przed złożeniem manuskryptu.

B17. J. Zielonka, M. Hardy, R. Michalski, A. Sikora, M. Zielonka, G. Cheng, O. Ouari, R. Podsiadły, B. Kalyanaraman, *Recent developments in the probes and assays for measurement of the activity of NADPH oxidases*, Cell Biochem. Biophys. **75** (2017) 335–349. **IF₂₀₁₇ = 1,455**, wkład własny = **10%**, liczba cytowań: **4**

Mój wkład polegał na konsultacjach naukowych i korekcie artykułu przed złożeniem manuskryptu.

B18. M. Hardy, J. Zielonka, H. Karoui, A. Sikora, R. Michalski, R. Podsiadły, M. Lopez, J. Vasquez-Vivar, B. Kalyanaraman, O. Ouari. *Detection and characterization of reactive oxygen and nitrogen species in biological systems by monitoring species-specific products*. Antioxid. Redox. Signal. **28** (2018) 1416–1432. **IF₂₀₁₇ = 6,530**, wkład własny = **15%**, liczba cytowań: **3**

Mój wkład polegał na przygotowaniu części tej pracy, dotyczącej wykorzystanie próbników boronowych do selektywnej detekcji nadtlendioazotynu oraz korekcie artykułu przed złożeniem manuskryptu.

6.2. Kierowanie projektami naukowymi oraz udział w takich projektach

1. *Od selektywnej detekcji biologicznych utleniaczy i małowcząsteczkowych związków sygnałowych do lepszego rozpoznania ich chemii biologicznej*, (2016–2021), projekt badawczy finansowany przez Narodowe Centrum Nauki w ramach programu SONATA BIS (2015/18/E/ST4/00235); **kierownik projektu**
2. *Synteza i charakterystyka nowych próbników przeznaczonych do detekcji nadtlendioazotynu*, (2012–2014), projekt badawczy finansowany przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach programu luventus Plus (IP 2011 049271); **kierownik projektu**
3. *Mechanistyczne aspekty oksydatywnej konwersji wybranych fluorogenicznych próbników do detekcji reaktywnych form tlenu*, (2010–2012), projekt badawczy finansowany przez

Fundację na rzecz Nauki Polskiej w ramach programu HOMING PLUS (HOMING PLUS/2010-1/12); **kierownik projektu**

4. *Śródbłonek naczyniowy w chorobach cywilizacyjnych: od badań poznawczych do oferty innowacyjnego leku o działaniu śródbłonkowym (Zadanie badawcze: Oddziaływania molekularne i reaktywność chemiczna)*, (2010–2015), projekt badawczy finansowany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (POIG 01.01.02-00-069/09); wykonawca
5. *Bezpośrednia identyfikacja reaktywnych metabolitów jako istotne kryterium oceny bezpieczeństwa stosowania substancji chemicznych*, (2007–2010), projekt badawczy finansowany przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (N205 003 32/0258); wykonawca
6. *Potencjał terapeutyczny pochodnych nikotynamidu w świetle ich działania na śródbłonek naczyniowy (Zadanie badawcze: Właściwości redoks pochodnych nikotynamidu i ich reaktywność w odniesieniu do reaktywnych form tlenu)*, (2004–2007), projekt finansowany przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (KBN K103/T09/2004); wykonawca

6.3. **Udział w konferencjach i seminariach naukowych i ich organizacja**

A. *Udział w konferencjach i seminariach naukowych (wyszczególniłem tylko te konferencje i seminaria naukowe, w których brałem udział jednocześnie prezentując wyniki badań)*

1. *Biological chemistry of nitroxyl (HNO) – the most elusive reactive nitrogen species* – Renata Smulik-Izydorczyk, Angelika Gerbich, Jacek Zielonka, Jakub Pięta, Jan Adamus, Radosław Michalski, Balaraman Kalyanaraman, Adam Sikora – seminarium naukowe „Signalling Molecules and Biological Oxidants – Chemistry, Detection and Redox Biology.” Konopnica, Polska, 2018 – **wykład**
2. *A kinetic study on the reactivity of azanone (HNO) toward its selected scavengers* – Adam Sikora, Renata Smulik-Izydorczyk, Angelika Gerbich, Jan Adamus, Radosław Michalski – The 9th PULS Conference on Pulse Investigations in Chemistry, Physics, and Biology. Łódź, Polska, 2018 – poster

3. *Oxidation of the selected probes for detection of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) in aqueous solutions of nitric oxide donors* – Karolina Dębowska, Renata Smulik-Izydorczyk, Jakub Pięta, Jan Adamus, Radosław Michalski, Adam Sikora – The 19th Biennial Meeting for the Society for Free Radical Research International (SFRRRI). Lizbona, Portugalia, 2018 – poster
4. *Kinetic and quantum-mechanical study on the decomposition of Piloty's acid derivatives – toward the understanding of factors controlling HNO release* – Adam Sikora, Renata Smulik-Izydorczyk, Angelika Gerbich, Michał Rostkowski, Jan Adamus, Jakub Pięta, Karolina Dębowska, Radosław Michalski, Andrzej Marcinek, Dominika Jarmoc, Agnieszka Leszczyńska, Karol Kramkowski – Gordon Research Conference "Oxygen Radicals". Ventura, CA, USA, 2018 – **wykład**
5. *Azanon (HNO) – chemia, chemia biologiczna i detekcja tajemniczej reaktywnej formy azotu* – Adam Sikora – seminarium naukowe w Instytucie Chemii Organicznej Politechniki Łódzkiej. Łódź, Polska, 2017 – **wykład na zaproszenie**
6. *N,N,N',N'-tetramethylhydroethidine (TMHE) – in search for novel probes for the detection of superoxide radical anion* – Adam Sikora, Radosław Michalski, Adrianna Mesjasz, Micael Hardy, Olivier Ouari, Jacek Zielonka, Balaraman Kalyanaraman – SFRBM's 24th Annual Meeting. Baltimore, USA, 2017 – poster
7. *The chemistry and chemical biology of HNO – a kinetic study on the reactivity of HNO toward its selected scavengers* – Renata Smulik-Izydorczyk, Adrianna Mesjasz, Angelika Gerbich, Jan Adamus, Radosław Michalski, Adam Sikora – 25th Kraków Conference on Endothelium. Kraków, Polska, 2017 – poster
8. *Nitroxyl (HNO) – Chemistry, biology, and detection of the most elusive reactive nitrogen species* – Adam Sikora – Second Adriatic Symposium on Biophysical Approaches in Biomedical Studies. Split, Chorwacja, 2017 – **wykład na zaproszenie**
9. *Nitroxyl (HNO) – chemistry, biology and detection* – Renata Smulik-Izydorczyk, Adrianna Mesjasz, Angelika Gerbich, Jacek Zielonka, Karolina Dębowska, Radosław Michalski, Jakub Pięta, Jan Adamus, Balaraman Kalyanaraman, Adam Sikora – EMBO Conference on Redox Biology. Moskwa–Petersburg, Rosja, 2017 – poster

10. *The pulse radiolytic study of one-electron oxidation of hydroethidine, the probe for the detection of superoxide radical anion* – Adam Sikora, Bartosz Michałowski, Radosław Michalski, Micael Hardy, Olivier Ouari, Jan Adamus, Andrzej Marcinek, Jacek Zielonka, Balaraman Kalyanaraman – 5th International Conference on Radiation and Applications in Various Fields of Research. Budwa, Czarnogóra, 2017 – poster
11. *N,N,N',N'-tetramethylhydroethidine (TMHE) – in search for better probes for the detection of superoxide radical anion* – Adam Sikora, Radosław Michalski, Adrianna Mesjasz, Micael Hardy, Olivier Ouari, Jan Adamus, Jacek Zielonka, Balaraman Kalyanaraman – OCC World Congress 2017 and Annual SFRR-E Conference. Berlin, Niemcy, 2017 – poster
12. *The chemistry and chemical biology of azanone (HNO) – a mysterious cousin of nitric oxide* – Adam Sikora, Renata Smulik-Izydorczyk, Adrianna Mesjasz, Angelika Gerbich, Radosław Michalski, Jan Adamus – International Workshop “Bioinorganic Redox Control”. Kraków, Polska, 2017 – **wykład na zaproszenie**
13. *Mechanistyczne aspekty działania wybranych próbników przeznaczonych do detekcji reaktywnych form tlenu i azotu* – Adam Sikora – seminarium naukowe w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej. Warszawa, Polska, 2016 – **wykład na zaproszenie**
14. *The kinetic study on the reactivity of nitroxyl (HNO) towards nitrite ions, hydroxylamine, selected nitrosocompounds and triphenylphosphines* – Adam Sikora, Renata Smulik-Izydorczyk, Adrianna Mesjasz, Jan Adamus – SfRBM's 23rd Annual Meeting. San Francisco, CA, USA, 2016 – poster
15. *What do we really know about boronate probes? (Molecular factors affecting reactivity)* – Adam Sikora – Xth International EPR Workshop on EPR in Biology and Medicine. Kraków, Polska, 2016 – **wykład na zaproszenie**
16. *What do we really know about HNO reactivity? Implications for its fluorescent imaging in vivo* – Adam Sikora – 17th International Conference on Oxidative Stress Reduction, Redox Homeostasis and Antioxidants. Paryż, Francja, 2016 – **wykład**
17. *HNO – tajemniczy kuzyn tlenu azotu* – Adam Sikora – VII Interdyscyplinarne Seminarium JCET. Wierchomla Wielka, Polska, 2016 – **wykład na zaproszenie**

18. *The use of boronate probes for the detection of reactive oxygen and nitrogen species* – Adam Sikora – 3rd International Conference and Exhibition on Biosensors and Bioelectronics. San Antonio, USA, 2014 – **wykład**
19. *The use of boronate probes in the studies on nitroxyl (HNO) reactivity* – Renata Smulik, Dawid Dębski, Bartosz Michałowski, Jan Adamus, Jacek Zielonka, Balaraman Kalyanaraman, Adam Sikora – Oxidative Stress Conference 2014. Oropesa, Hiszpania, 2014 – **wykład**
20. *The fluorescein-based boronate probes FbisBBE and FBBE as useful tools for the detection of peroxynitrite* – Karolina Gumińska, Dawid Dębski, Bartosz Michałowski, Jan Adamus, Tomasz Wójcik, Stefan Chłopicki, Adam Sikora – 12th ISANH International Conference on Oxidative Stress, Redox States and Antioxidants. Clinical Advances – Challenges – Perspectives. Paryż, Francja, 2013 – poster
21. *The effect of glutathione on the oxidation of hydroethidine in superoxide generating system: characteristic and the importance of HE radical cation* – Adam Sikora, Bartosz Michałowski, Dawid Dębski, Łukasz Piotrowski, Jan Adamus, Andrzej Marcinek – 6th European Young Investigator Conference. Słubice, Polska, 2013 – poster
22. *Reactivity of mitochondria-targeted arylboronic acid isomers toward peroxynitrite* – Adam Sikora, Jacek Zielonka, Jan Adamus, Dawid Dębski, Agnieszka Dybała-Defratyka, Joy Joseph, Richard C. Hartley, Michael P. Murphy, Balaraman Kalyanaraman – 3rd World Congress on Targeting Mitochondria. Strategies, Innovations and Clinical Applications. Berlin, Niemcy, 2012 – poster
23. *Reactivity of resorufin-based fluorogenic probe PC1 toward ROS/RNS and its use in the studies of peroxynitrite reactivity* – Adam Sikora, Łukasz Piotrowski, Dawid Dębski, Karolina Gumińska, Jan Adamus, Andrzej Marcinek, Jacek Zielonka, Balaraman Kalyanaraman – SFRBM's 19th Annual Meeting. San Diego, CA, USA, 2012 – poster
24. *Mechanistic aspects of the reaction of peroxynitrite with mitochondria-targeted arylboronic acid isomers* – Adam Sikora, Jacek Zielonka, Jan Adamus, Dawid Dębski, Bartosz Michałowski, Joy Joseph, Michael P. Murphy, Balaraman Kalyanaraman – IARC Workshop on Reactive Intermediates for Young Scholars and Graduate Students. Spała, Polska, 2012 – **wykład**

25. *The UPLC/MS study of the reaction of glutathione with boronate resorufin-based fluorogenic probe PC1* – Adam Sikora, Bartosz Michałowski, Dawid Dębski, Jan Adamus, Andrzej Marcinek – ISC'2012. 29th International Symposium on Chromatography. Toruń, Polska, 2012 – poster
26. *Reactivity of resorufin-based fluorogenic boronate probe PC1 towards ROS/RNS and its use in the studies of peroxynitrite reactivity* – Adam Sikora, Jan Adamus, Łukasz Piotrowski, Dawid Dębski, Karolina Gumińska, Andrzej Marcinek, Piotr Kwiatkowski – 39th Annual Meeting of the European Radiation Research Society. Vietri sul Mare, Włochy, 2012 – poster
27. *Different reaction profiles of mitochondria-targeted arylboronic acid isomers with peroxynitrite* – Adam Sikora, Jacek Zielonka, Jan Adamus, Dawid Debski, Joy Joseph, Michael P. Murphy, Balaraman Kalyanaraman – SFRBM's 18th Annual Meeting, Atlanta, GA, USA, 2011 – poster
28. *Charakterystyka produktów pośrednich jednoelektronowego utleniania Amplex Red, fluorescencyjnego próbnika na reaktywne formy tlenu* – Adam Sikora, Dawid Dębski, Jan Adamus – 54. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego i Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego. Lublin, Polska, 2011 – poster
29. *The pulse radiolysis study on the transient products of one-electron oxidation of fluorescent probe Amplex Red* – Adam Sikora, Dawid Dębski, Jan Adamus, Jacek Zielonka, Balaraman Kalyanaraman – EYIC. 5th European Young Investigator Conference. Słubice, Polska, 2011 – poster
30. *Novel tools in the research on antioxidants – the global profiling of ROS/RNS in cell-free and cellular systems* – Adam Sikora, Jacek Zielonka, Monika Zielonka, Joy Joseph, Jan Adamus, Agnieszka Dybała-Defratyka, Łukasz Piotrowski, Michael Hardy, Olivier Ouari, Balaraman Kalyanaraman – ICRR 2011. 14th International Congress of Radiation Research. Incorporating 57th Annual Meeting of the Radiation Research Society. Warszawa, Polska, 2011 – **wykład na zaproszenie**
31. *Redox properties of aryl boronate compounds* – Adam Sikora, Łukasz Piotrowski, Agnieszka Dybała-Defratyka, Jan Adamus, Andrzej Marcinek, Jacek Zielonka, Balaraman

- Kalyanaraman. SFRR-Europe 2011 Meeting. "Redox Biology and Micronutrients: From Signaling to Translation and Back." Istambuł, Turcja, 2011 – poster
32. *The mechanism of the oxidative transformation of boronate compounds – a quantum mechanical study* – Adam Sikora, Agnieszka Dybała-Defratyka, Jacek Zielonka, Andrzej Marcinek, Balaraman Kalyanaraman – SFRBM's 17th Annual Meeting. SFRR's 15th Biennial Meeting. Orlando, Floryda, USA, 2010 – poster
33. *The mechanistic aspects of the reaction of peroxyxynitrite with boronate compounds* – Adam Sikora, Jacek Zielonka, Marcos Lopez, Joy Joseph, Andrzej Marcinek, Balaraman Kalyanaraman – VIIIth International Workshop on EPR (ESR) in Biology and Medicine. Kraków, Polska, 2010 – **wykład**
34. *Oxidation of coumarin boronate to hydroxycoumarin by different fluxes of nitric oxide and superoxide: quantitative measurements of peroxyxynitrite under various nitric oxide/superoxide fluxes* – Adam Sikora, Jacek Zielonka, Joy Joseph, Balaraman Kalyanaraman – 16th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine. San Francisco, CA, USA, 2009 – poster
35. *Apocynin inhibits carbonate radical-induced aggregation of human Cu,Zn-SOD* – Adam Sikora, Jacek Zielonka, Łukasz Piotrowski, Christopher Andrekopoulos, Joy Joseph, Jan Adamus, Andrzej Marcinek, X. Allen Li, Balaraman Kalyanaraman – SFRBM's 15th Annual Meeting, Indianapolis, IN, USA, 2008 – poster
36. *Characterization of clozapine and olanzapine radical cations, radicals and nitrenium cations* – Adam Sikora, Andrzej Marcinek – EYIC'07. 3rd European Young Investigator Conference. Słubice, Polska, 2007 – poster
37. *Spectroscopic characterization of diphenylnitrosamine transient oxidation products* – Adam Sikora, Jan Adamus, Andrzej Marcinek – VII International Workshop on EPR(ESR) in Biology and Medicine. Kraków, Polska, 2007 – poster
38. *Charakterystyka anionorodników dihalogenkowych i dipseudohalogenkowych generowanych radiacyjnie w chlorku metylenu*. Adam Sikora, Radosław Michalski, Jan Adamus, Andrzej Marcinek. XIV Zjazd PTBR. Kielce, Polska, 2007 – poster
39. *Nowy typ matryc niskotemperaturowych do badania rodnioko-jonów* – Adam Sikora, Jan Adamus, Andrzej Marcinek – XLIX Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego

i Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego. Gdańsk, Polska, 2006 – poster

B. Udział w organizacji konferencji naukowych

1. Seminarium naukowe „Signalling Molecules and Biological Oxidants – Chemistry, Detection and Redox Biology”, Konopnica, Polska, 2018 – organizator
2. First Adriatic Symposium on Biophysical Approaches in Biomedical Studies, Split, Chorwacja, 2014 – członek *“advisory board”* oraz *“session chair”*
3. “Oxygen Radicals” Gordon-Merck Research Seminar: (Patho)physiology of Redox Processes, Ventura, CA, USA, 2014 – *“discussion leader”*
4. 6th European Young Investigator Conference, Słubice, Polska, 2013 – organizator
5. IARC Workshop on Reactive Intermediates for Young Scholars and Graduate Students. Spała, Polska, 2012 – organizator

6.4. Członkostwo w towarzystwach naukowych

- Society for Free Radical Biology and Medicine/Society for Redox Biology and Medicine – 2008–obecnie – członek towarzystwa
- Society for Free Radical Research – Europe – 2011–obecnie – członek towarzystwa

6.5. Staże w krajowych i zagranicznych ośrodkach naukowych

1. 07.2008–07.2009 – staż podoktorski w Department of Biophysics, Free Radical Research Center, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, WI, USA – prowadziłem badania dotyczące mechanizmu i kinetyki reakcji utleniania związków boronowych przez nadtlenuk wodoru, kwas chlorowy (I) i nadtlenuk azotynu.
2. 10–11.2009 – krótkoterminowy staż badawczy w Department of Biophysics, Free Radical Research Center, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, WI, USA – prowadziłem badania dotyczące wykorzystania kwasu 7-boronokumarynowego, jako próbnika fluorescencyjnego do detekcji nadtlenuk azotynu.

3. 08–09.2010 – krótkoterminowy staż badawczy w Department of Biophysics, Free Radical Research Center, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, WI, USA – prowadziłem badania z wykorzystaniem techniki pułapowania spinowego, których celem było określenie mechanizmu wolnorodnikowej ścieżki reakcji związków boronowych z nadtlenoazotynem.
4. 07–08.2011 – krótkoterminowy staż badawczy w Department of Biophysics, Free Radical Research Center, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, WI, USA – prowadziłem badania dotyczące charakterystyki reakcji nadtlenoazotynu z izomerycznymi kwasami fenyloboronowymi zawierającymi w swej strukturze podstawnik z grupą trifenylofosfoniową, jako próbnikami do detekcji nadtlenoazotynu w obrębie mitochondriów.
5. 07.2018 – krótkoterminowy staż badawczy w Department of Biophysics, Free Radical Research Center, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, WI, USA – prowadziłem badania dotyczące charakterystyki nowych próbników boronowych dedykowanych do detekcji nadtlenoazotynu i nadtlenku wodoru w obrębie mitochondriów, jak i możliwości detekcji nadtlenoazotynu produkowanego przez śródbłonkową syntazę tlenu azotu (eNOS).

6.6. Międzynarodowa i krajowa współpraca naukowa

Podczas ostatnich 9 lat, jakie minęły od zakończenia mojego stażu podoktorskiego w Medical College of Wisconsin w zespole badawczym prof. Balaramana Kalyanaramana, utrzymywałem bliską współpracę naukową z tą grupą badawczą, co znajduje swoje odzwierciedlenie we współautorstwie wielu artykułów naukowych (*vide supra*). Do innych długoterminowych partnerów naukowych, z którymi dość blisko współpracuję, zaliczam również następujących naukowców z Europy i z Polski:

- dr Micaela Hardy’ego (Aix Marseille Universite, Institut de Chimie Radicale, Marsylia, Francja) – współpraca obejmuje prace nad charakterystyką nowych próbników fluorescencyjnych przeznaczonych do detekcji anionorodnika ponadtlenkowego, przede wszystkim związków z grupy pochodnych hydroetydyny;

- prof. dr. hab. Stefana Chłopickiego (Uniwersytet Jagielloński, Jagiellońskie Centrum Rozwoju Leków) – współpraca obejmowała charakterystykę własności soli pirydyniowych, będących jednocześnie donorami tlenu azotu, jak również rozwijanie metodyki detekcji reaktywnych form tlenu i azotu z wykorzystaniem próbników molekularnych;
- dr. hab. Karola Kramkowskiego (Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Zakład Chemii Fizycznej) – współpraca dotyczy charakterystyki nowych donorów azanonu z grupy pochodnych kwasu Piloty’ego.

We wspomnianym czasie współpracowałem również z innymi zespołami badawczymi w Polsce i na świecie udostępniając na ich potrzeby związki zsyntezowane w ramach projektów badawczych, których byłem kierownikiem – przede wszystkim niedostępne komercyjnie próbniiki boronowe, lecz również aktywne biologicznie związki „celowane” do mitochondriów.

6.7. Recenzowanie publikacji w czasopismach międzynarodowych

- *Biosensors and Bioelectronics* – 3 recenzje
- *Chemical Communications* – 1 recenzja
- *Free Radical Biology and Medicine* – 4 recenzje
- *Free Radical Research* – 1 recenzja
- *Journal of Analytical Methods in Chemistry* – 1 recenzja
- *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* – 4 recenzje
- *Talanta* – 2 recenzje
- *Dyes and Pigments* – 1 recenzja

6.8. Udział w zespołach eksperckich i konkursowych

- Recenzent streszczeń naukowych nadesłanych na konferencję naukową 24th Annual Meeting of the Society for Redox Biology and Medicine (SfRBM), Baltimore, MD, 2017.
- Recenzent streszczeń naukowych nadesłanych na konferencję naukową 25th Annual Meeting of the Society for Redox Biology and Medicine (SfRBM), Chicago, IL, 2018.

6.9. Najważniejsze nagrody i wyróżnienia związane z działalnością naukową

- 2009 r. – nagroda Rektora Politechniki Łódzkiej za dorobek naukowy
- 2011 r. – nagroda Rektora Politechniki Łódzkiej za dorobek naukowy
- 2015 r. – nagroda Rektora Politechniki Łódzkiej za dorobek naukowy
- 2015 r. – *Recognized reviewer* – wyróżnienie czasopisma *Free Radical Biology and Medicine*
- 2017 r. – nagroda Rektora Politechniki Łódzkiej za dorobek naukowy
- 2017 r. – *Outstanding reviewer* – wyróżnienie czasopisma *Free Radical Biology and Medicine*
- 2017 r. – *Recognized reviewer* – wyróżnienie czasopisma *Biosensors and Bioelectronics*
- 2018 r. – nagroda Rektora Politechniki Łódzkiej za dorobek naukowy
- 2018 r. – *Recognized reviewer* – wyróżnienie czasopisma *Talanta*
- 2018 r. – *Outstanding reviewer* – wyróżnienie czasopisma *Talanta*
- 2018 r. – *Recognized reviewer* – wyróżnienie czasopisma *Dyes and Pigments*

7. Działalność dydaktyczna

7.1. Prowadzone zajęcia dydaktyczne

W okresie po uzyskaniu stopnia doktora prowadziłem zajęcia z następujących przedmiotów:

- *Chemia fizyczna* – laboratorium (studia I stopnia, różne kierunki studiów);
- *Izotopowe metody badania materiałów budowlanych* – laboratorium (studia I stopnia, kierunek *Chemia budowlana*);
- *Wolne rodniki w chemii, biologii i medycynie* – wykład i laboratorium (studia I stopnia, kierunek *Chemia*);
- *Podstawy biofarmacji i farmakokinetyki* – wykład i laboratorium (studia I stopnia, kierunek *Chemia*);

- *Termodynamika techniczna i chemiczna* – wykład, ćwiczenia i laboratorium (studia I stopnia, kierunek *Technologia chemiczna*).

7.2. Opracowane programy nauczania przedmiotów akademickich

1. Opracowanie programu nauczania dla przedmiotu *Wolne rodniki w chemii, biologii i medycynie* (studia I stopnia, kierunek *Chemia*, specjalność *Chemia biologiczna*).
2. Opracowanie programu nauczania dla przedmiotu *Podstawy biofarmacji i farmakokinetiki* (studia II stopnia, kierunek *Chemia*, specjalność *Chemia medyczna*).
3. Opracowanie programu nauczania dla przedmiotu *Oxidative Modifications of Biomolecules and Biopolymers (Oksydacyjne modyfikacje biocząsteczek i biopolimerów)* (studia I stopnia, kierunek *Advanced Biobased and Bioinspired Materials*, przedmiot prowadzony w języku angielskim).

7.3. Prace inżynierskie wykonane pod kierunkiem habilitanta

1. Adrianna Mesjasz, *Badanie reaktywności HNO (azanonu) względem jonów azotanowych (III), hydroksyloaminy, wybranych związków nitrozowych i wybranych fosfin*, Łódź, 2016 (kierownik pracy dyplomowej).
2. Angelika Gerbich, *Charakterystyka wybranych donorów azanonu*, Łódź, 2016 (kierownik pracy dyplomowej).
3. Kinga Zawiślak, *Charakterystyka kwasu 1-boronopirenowego jako profluorescencyjnego próbnika do wykrywania reaktywnych form tlenu i azotu*, Łódź, 2016 (kierownik pracy dyplomowej).
4. Kacper Bajorski, *Utlenianie wybranych próbników przeznaczonych do detekcji reaktywnych form tlenu (RFT) i azotu (RFA) w wodnych roztworach donorów tlenu azotu*, Łódź, 2018 (kierownik pracy dyplomowej).
5. Paweł Zerbe, *Charakterystyka reaktywności próbnika difenilo-1-pirenylofosfiny względem wybranych RFT i RFA*, Łódź, 2018 (kierownik pracy dyplomowej).

7.4. Prace magisterskie wykonane pod kierunkiem habilitanta

1. Dawid Dębski, *Charakterystyka nietrwałych produktów pośrednich jednoelektronowego utleniania 10-acetylo-3,7-dihydroksyfenoksazyny*, Łódź, 2011 (kierownik pracy dyplomowej).
2. Katarzyna Bandzierz, *Charakterystyka produktów pośrednich jednoelektronowego utleniania wybranych związków boronowych*, Łódź, 2011 (kierownik pracy dyplomowej).
3. Karolina Grzelak, *Charakterystyka reaktywności boronowej pochodnej rezorufiny (PC1) względem wybranych reaktywnych form tlenu*, Łódź, 2012 (kierownik pracy dyplomowej).
4. Karolina Gumińska, *Reaktywność boronowej pochodnej rezorufiny PC1 względem nadtlenoazotynu. Zastosowanie PC1 w badaniach reaktywności nadtlenoazotynu i kwasu podchlorawego*, Łódź, 2012 (kierownik pracy dyplomowej).
5. Karolina Pierzchała, *Charakterystyka reaktywności hydroetydyny względem wybranych rodników peroksylowych*, Łódź, 2013 (kierownik pracy dyplomowej).
6. Renata Smulik, *Wykorzystanie próbników boronowych w badaniach reaktywności HNO₃*, Łódź, 2013 (kierownik pracy dyplomowej).
7. Magdalena Maj, *Charakterystyka boronowych pochodnych kumaryny jako profluorescencyjnych próbników przeznaczonych do detekcji nadtlenoazotynu*, Łódź, 2013 (kierownik pracy dyplomowej).
8. Angelika Gerbich, *Charakterystyka 4-((9-akrydynokarbonylo)amino)-2,2,6,6-tetrametylopiperydino-1-oksylu (TEMPO-9-Ac), jako profluorescencyjnego próbника przeznaczonego do detekcji azanonu (HNO₂)*, Łódź, 2017 (kierownik pracy dyplomowej).

7.5. Opieka naukowa nad doktorantami w charakterze promotora pomocniczego

1. Dawid Dębski, *Mechanistyczne aspekty oksydatywnej konwersji próbników przeznaczonych do detekcji nadtlenku wodoru i nadtlenoazotynu*, Łódź, 2016.
2. Bartosz Michałowski, *Mechanistyczne aspekty detekcji reaktywnych form tlenu i azotu z wykorzystaniem wybranych próbników fluorescencjogennych*, Łódź, 2017.

3. Karolina Dębowska, *Charakterystyka wybranych katalitycznych antyoksydantów oraz próbników wykorzystywanych do detekcji nadtlenoazotynu* (praca w przygotowaniu).
4. Renata Smulik-Izydorczyk, *Charakterystyka reaktywności azanonu (HNO) i wybranych jego donorów* (praca po recenzjach, obrona zaplanowana na 5 lutego 2019 r.).

8. Działalność organizacyjna

10.2016–obecnie Zastępca Dyrektora Międzyresortowego Instytutu Techniki Radiacyjnej ds. Dydaktycznych, Wydział Chemiczny Politechniki Łódzkiej

10.2016–obecnie członek Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej

15.02.2019 r.

ASilera

Autoreferat w języku angielskim

**Mechanistyczne aspekty reaktywności i wykorzystanie wybranych próbników
molekularnych przeznaczonych do detekcji reaktywnych form tlenu i azotu**

dr inż. Adam Sikora

Międzyresortowy Instytut Techniki Radiacyjnej

Wydział Chemiczny Politechniki Łódzkiej

**Mechanistic aspects of reactivity and use of selected molecular probes
for detection of reactive oxygen and nitrogen species**

Dr. Adam Sikora

Institute of Applied Radiation Chemistry

Faculty of Chemistry, Lodz University of Technology, Lodz, Poland

Contents

1. Personal data.....	63
2. Education.....	63
3. Employment.....	63
4. Numerical data on scientific accomplishments.....	64
5. Scientific achievements, the habilitation thesis is based on.....	64
6. Other scientific achievements.....	89
6.1. Publications.....	89
6.2. Participation in research projects.....	94
6.3. Participation in conferences and conference committees.....	95
6.4. Membership in scientific organizations and associations.....	101
6.5. Short- and long-term scientific visits.....	101
6.6. International and national collaborations.....	102
6.7. Reviewing scientific manuscripts.....	102
6.8. Participation in expert and scientific competition jury panels.....	103
6.9. Major awards related to scientific and educational activity.....	103
7. Educational activity.....	104
7.1. Academic courses.....	104
7.2. Preparation of teaching programs of academic courses.....	104
7.3. Supervision of BSc students.....	104
7.4. Supervision of MSc students.....	105
7.5. Supervision of PhD students.....	106
8. Academic administrative appointments.....	106

1. Personal data

Name: Adam Bartłomiej Sikora

Date and place of birth: 21.03.1977, Lodz

2. Education

2007 Ph.D. in Chemistry, thesis entitled: *Mechanistic aspects of nitrenium cations formation associated with electron transfer processes*, Ph.D. advisor: Prof. Andrzej Marcinek, Faculty of Chemistry, Lodz University of Technology, Poland

2002 M.Sc. in Chemistry, thesis entitled: *Reactivity of nicotinamide and its metabolites towards reactive oxygen species*, supervisor: Prof. Jerzy Gębicki, Faculty of Chemistry, Lodz University of Technology, Poland

3. Employment

2006–2009 Teaching and Research Assistant at the Institute of Applied Radiation Chemistry, Faculty of Chemistry, Lodz University of Technology, Poland

2008–2009 Postdoctoral Fellow, Department of Biophysics, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, Wisconsin, USA

2009–present Assistant Professor at the Institute of Applied Radiation Chemistry, Faculty of Chemistry, Lodz University of Technology, Poland

4. Numerical data on scientific accomplishments

Below are the data summarizing my scientific accomplishments, including the numerical data from the *Web of Science* and *Scopus* databases, as of 9th of January, 2019:

Number of scientific papers: **35**

Number of scientific papers discussed as an “achievement”: **11**

Total number of citations (according to *Scopus*): **952**

Total number of citations, excluding self-citations (according to *Scopus*): **823**

Hirsch Index (according to *Scopus*): **15**

Total impact factor of all publications: **176.02**

Total impact factor (based on 11 papers discussed as an “achievement”): **98.95**

Citations of scientific papers discussed as an “achievement” (according to *Scopus*): **509**

5. Scientific achievements, the habilitation thesis is based on

a) Title of the scientific achievement:

Mechanistic aspects of reactivity and use of selected molecular probes for detection of reactive oxygen and nitrogen species

The presented habilitation thesis is based on 11 co-authored scientific papers.

b) List of scientific publications, the habilitation thesis is based on.

H1. 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. **47** (2009) 1401–7. **IF₂₀₀₉ = 6.081**, my contribution = **70%**, number of citations: **158**

My contribution to this paper consisted of design and running most of experiments, including all measurements of the chemical reactivity of boronate compounds, analysis, interpretation and discussion of the results, preparation of most of the figures and writing the first version of the manuscript.

H2. 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. **285** (2010) 14210–6. **Article selected as JBC Paper of the Week.** IF₂₀₁₀ = **5.328**, my contribution = **40%**, number of citations: **118**

My contribution to this paper consisted of design and running part of experiments, including the experiments on oxidation of the CBA probe by peroxynitrite formed from different flux ratios of co-generated nitric oxide and superoxide, analysis, interpretation and discussion of the results of those experiments and preparation of figures illustrating them, consultations and the revision of the final manuscript.

H3. 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. **24** (2011) 687–97. IF₂₀₁₁ = **3.779**, my contribution = **70%**, number of citations: **53**

My contribution to this paper is consisted of design and running most of experiments, including involvement in the spin-trapping of the phenyl radicals formed in the reaction of peroxynitrite with boronate compounds, analysis, interpretation and discussion of the results, preparation of figures and writing the first version of the manuscript.

H4. A. Sikora, J. Zielonka, J. Adamus, D. Debski, A. Dybala-Defratyka, B. Michalowski, J. Joseph, R.C. Hartley, M.P. Murphy, B. Kalyanaraman, *Reaction between peroxynitrite and triphenylphosphonium-substituted arylboronic acid isomers: identification of diagnostic marker products and biological implications*, Chem. Res. Toxicol. **26** (2013) 856–67. IF₂₀₁₃ = **4.190**, my contribution = **70%**, number of citations: **27**

My contribution to this paper consisted of design and running most of experiments, including involvement in the pulse radiolysis kinetic experiments on the reactivity of mitochondria-targeted boronate probes and in spin-trapping experiments of the phenyl radicals formed in the reaction of peroxynitrite with studied boronate compounds, analysis, interpretation and discussion of the results, preparation of most of the figures and writing the first version of the manuscript.

H5. R. Smulik, D. Debski, J. Zielonka, B. Michalowski, 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. **289** (2014) 35570–81. **IF₂₀₁₄ = 4.573**, my contribution = **40%**, number of citations: **32**

My contribution to this paper consisted of project concept, design of most of the experiments, including the development of novel method for the kinetic studies of HNO reactivity, based on the competition kinetics and the use of profluorescent boronate probes for detection of peroxynitrite formed in the system, interpretation and discussion of the results, edition of manuscript and funding acquisition.

H6. K. Debowska, D. Debski, B. Michalowski, A. Dybala-Defratyka, T. Wojcik, R. Michalski, M. Jakubowska, A. Selmi, R. Smulik, L. Piotrowski, J. Adamus, A. Marcinek, S. Chlopicki, A. Sikora, *Characterization of fluorescein-based monoboronate probe and its application to the detection of peroxynitrite in endothelial cells treated with doxorubicin*, Chem. Res. Toxicol. **29** (2016) 735–46. **IF₂₀₁₆ = 3.278**, my contribution = **40%**, number of citations: **13**

My contribution to this paper consisted of paper concept, design of most of the experiments, interpretation and discussion of the results, edition of manuscript and funding acquisition.

H7. D. Debski, R. Smulik, J. Zielonka, B. Michalowski, M. Jakubowska, K. Debowska, J. Adamus, A. Marcinek, B. Kalyanaraman, A. Sikora, *Mechanism of oxidative conversion of Amplex® Red to resorufin: Pulse radiolysis and enzymatic studies*, Free Radic. Biol. Med. **95** (2016) 323–32. **IF₂₀₁₆ = 5.606**, my contribution = **40%**, number of citations: **24**

My contribution to this paper consisted of paper concept, design of most of the experiments, involvement in the pulse radiolysis kinetic experiments on the reactivity of Amplex Red® probe towards selected one-electron oxidants, interpretation and discussion of the results, edition of manuscript and funding acquisition.

H8. R. Smulik-Izydorczyk, A. Mesjasz, A. Gerbich, J. Adamus, R. Michalski, A. Sikora, *A kinetic study on the reactivity of azanone (HNO) toward its selected scavengers: Insight into its chemistry and detection*, Nitric Oxide **69** (2017) 61–68. **IF₂₀₁₇ = 4.367**, my contribution = **40%**, number of citations: **3**

My contribution to this paper consisted of paper concept, design of most of the experiments, interpretation and discussion of the results, edition of manuscript and funding acquisition.

H9. J. Zielonka, J. Joseph, A. Sikora, M. Hardy, O. Ouari, J. Vasquez-Vivar, G. Cheng, M. Lopez, B. Kalyanaraman, *Mitochondria-targeted triphenylphosphonium-based compounds: syntheses, mechanisms of action, and therapeutic and diagnostic applications*, Chem. Rev. **117** (2017) 10043–10120. **IF₂₀₁₇ = 52.613**, my contribution = **20%**, number of citations: **79**

My contribution to this paper consisted of the preparation of the part of this review discussing the properties of mitochondria-targeted molecular probes for the detection of reactive oxygen, nitrogen and sulfur species (except a part on the mitochondria targeted spin traps) as well as some other, minor parts of the manuscript.

H10. R. Smulik-Izydorczyk, K. Dębowska, J. Pięta, R. Michalski, A. Marcinek, A. Sikora, *Fluorescent probes for the detection of nitroxyl (HNO)*, Free Radic. Biol. Med. **128** (2018) 69–83. **IF₂₀₁₇ = 6.020**, my contribution = **60%**, number of citations: **2**

My contribution to this paper consisted of paper concept and the preparation of the major part of this review discussing the properties of three classes of HNO-reactive probes: fluorogenic probes constructed from fluorophores covalently linked to copper complexes, triphenylphosphine-based probes and the probes being esters of fluorescent dyes and 2-mercapto-2-methylpropionic acid. I have also prepared the final version of the manuscript.

H11. R. Smulik-Izydorczyk, M. Rostkowski, A. Gerbich, D. Jarmoc, J. Adamus, A. Leszczyńska, R. Michalski, A. Marcinek, K. Kramkowski, A. Sikora, *Decomposition of Piloty's acid derivatives – Toward the understanding of factors controlling HNO release*, Arch. Biochem. Biophys. **661** (2019) 132–144. **IF₂₀₁₇ = 3.118**, my contribution = **40%**, number of citations: **0**

My contribution to this paper consisted of paper concept, design of most of the experiments, interpretation and discussion of the results, edition of manuscript and funding acquisition.

c. Description of the scientific aims and the achievements of the above-mentioned papers

Introduction

The characterization of mechanistic aspects of the reactivity of selected molecular probes designed for detection of reactive oxygen and nitrogen species, as well as the practical use of those probes in chemical, enzymatic and biological systems, is the subject of papers selected for the habilitation thesis.

Over the last 50 years, there has been tremendous progress in the understanding of chemical reactivity and biological role of reactive oxygen species (**ROS**) and reactive nitrogen species (**RNS**), including superoxide radical anion ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), hypohalous acids (**HOCl**, **HOBr**), hypothiocyanous acid (**HOSCN**), nitric oxide ($\bullet\text{NO}$), nitrogen dioxide ($\bullet\text{NO}_2$) and peroxynitrite (**ONOO⁻**). It is widely accepted that generation of those species is involved in different physiological and pathophysiological processes. Despite the decades of the studies on the biological role of **ROS** and **RNS**, the detection and quantitation of those species still remains a challenge due to their high reactivity and short lifetime in biological systems.

In general, detailed characterization of specific products generated from biomolecules (proteins, **DNA**, or lipids) in the reactions with different **ROS** and **RNS** is required to understand the biological importance of **ROS**- and **RNS**-derived redox processes. This can provide specific methods of detection of those species but does not provide a real-time monitoring of their formation in biological systems. The latter is possible with the use of fluorescent techniques and luminescent molecular probes. [1]

Several **ROS**- and **RNS**-sensitive probes, reacting with those species with the formation of easily detectable and relatively stable products have been developed and the fluorescent or chemiluminescent probes have become widely used in the studies on the role of **ROS** and **RNS** in physiological and pathophysiological processes. The rational use of those probes requires, however, a deep understanding of the mechanism of their action. In most cases, the probe is oxidized to the corresponding fluorescent product. Determination of the probe reactivity pattern and the reactivity pattern of the primary products of those oxidation reactions (i.e., probe-derived radicals) is of great importance for understanding of mechanisms of the oxidative transformation of the probe and proper interpretation of experimental data obtained with its use. [1, 2]

Among **ROS** and **RNS** mentioned above, peroxynitrite is a biological oxidant of great interest. [3] Peroxynitrite anion (**ONOO⁻**) and peroxynitrous acid (**ONOOH**), being a Brønsted acid-base pair ($pK_a(\text{ONOOH}) = 6.8$), [3] are highly reactive species formed *in vivo* through the recombination reaction of two biologically important radicals: superoxide radical anion (**O₂^{•-}**) and nitric oxide (**•NO**). The reaction between those radicals takes place at nearly diffusion-controlled rate (reaction 1, $k_1 = 0.4\text{--}1.6 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [3] and outcompetes other cellular routes of **•NO** and **O₂^{•-}** consumption (e.g. superoxide dismutases, **SODs**). There are several scenarios of pathophysiological peroxynitrite production.



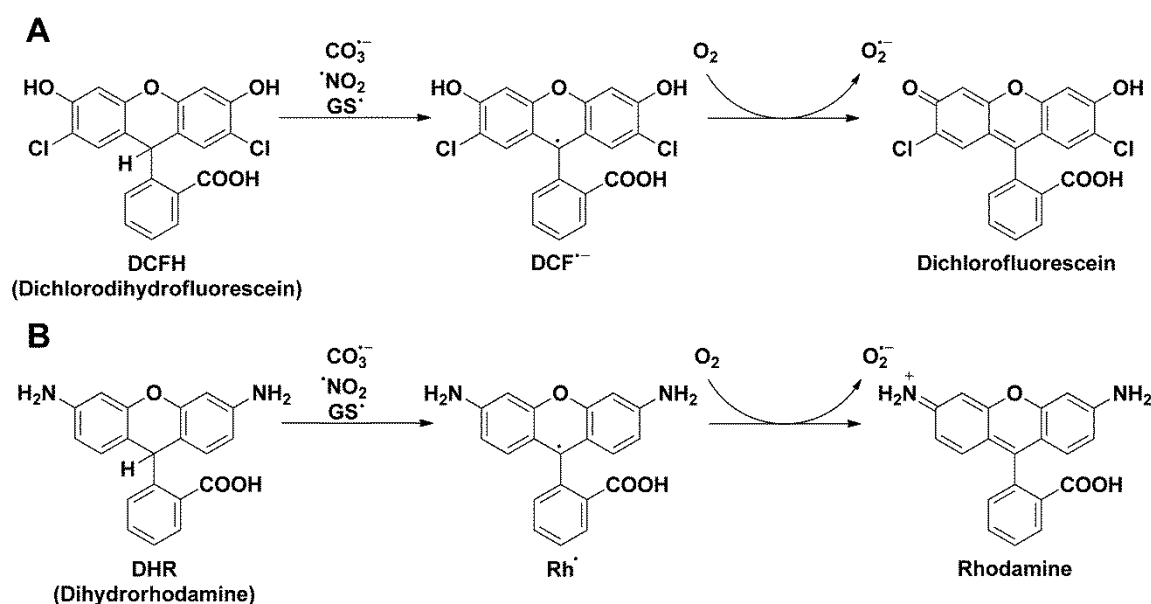
Peroxynitrite is a strong one- and two-electron oxidant [$E^\circ(\text{ONOO}^-, 2\text{H}^+/\text{•NO}_2) = 1.4 \text{ V}$ and $E^\circ(\text{ONOO}^-, 2\text{H}^+/\text{NO}_2^-) = 1.2 \text{ V}$ at pH 7). [4] Importantly, peroxynitrite is also a source of highly oxidizing radicals, which can be formed in fractional yields through a homolytic cleavage of the **O-O** bond of **ONOOH** (reaction 2, $k_2 = 0.9 \text{ s}^{-1}$ at pH 7.4 and 37 °C)[5] or via the reaction of **ONOO⁻** with carbon dioxide (reaction 4, $k_4 = 5.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, at 37 °C). [6] Peroxynitrous acid undergoes also isomerization to nitrate anion (reaction 3).



The unstable nitrosoperoxocarbonate anion (**ONOOCO₂⁻**) formed from the reaction between **ONOO⁻** and **CO₂** (reaction 4) decays to nitrogen dioxide radical (**•NO₂**) and carbonate radical anion (**CO₃^{•-}**) (reaction 5, $\eta = 35\%$ of initial **ONOOCO₂⁻**) or to nitrate and carbon dioxide (reaction 6, $\eta = 65\%$ of initial **ONOOCO₂⁻**). [6] This reaction leads to the formation of two potent one-electron oxidants – nitrogen dioxide (**•NO₂**) and carbonate radical anion (**CO₃^{•-}**). [7]

For many years most of the strategies for peroxynitrite detection and quantification were depended on the reaction of probes, being the reduced fluorescent dyes, with peroxynitrite-derived radicals (**CO₃^{•-}**, **•NO₂**, **•OH**). Such redox probes – dichlorodihydrofluorescein (**DCFH**)

and dihydrorhodamine (**DHR**) yield fluorescent products by a free radical mechanism (Scheme 1). [8] First of all, detection of **ROS** and **RNS** with the use of those probes is nonspecific. Moreover, in a series of papers on the chemistry of dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine it has been demonstrated that the **DCFH**- and **DHR**-derived radicals, being products of their one-electron oxidation, react with molecular oxygen producing superoxide. [9, 10]



Scheme 1. Mechanism of one-electron oxidation of (A) DCFH and (B) DHR probes.

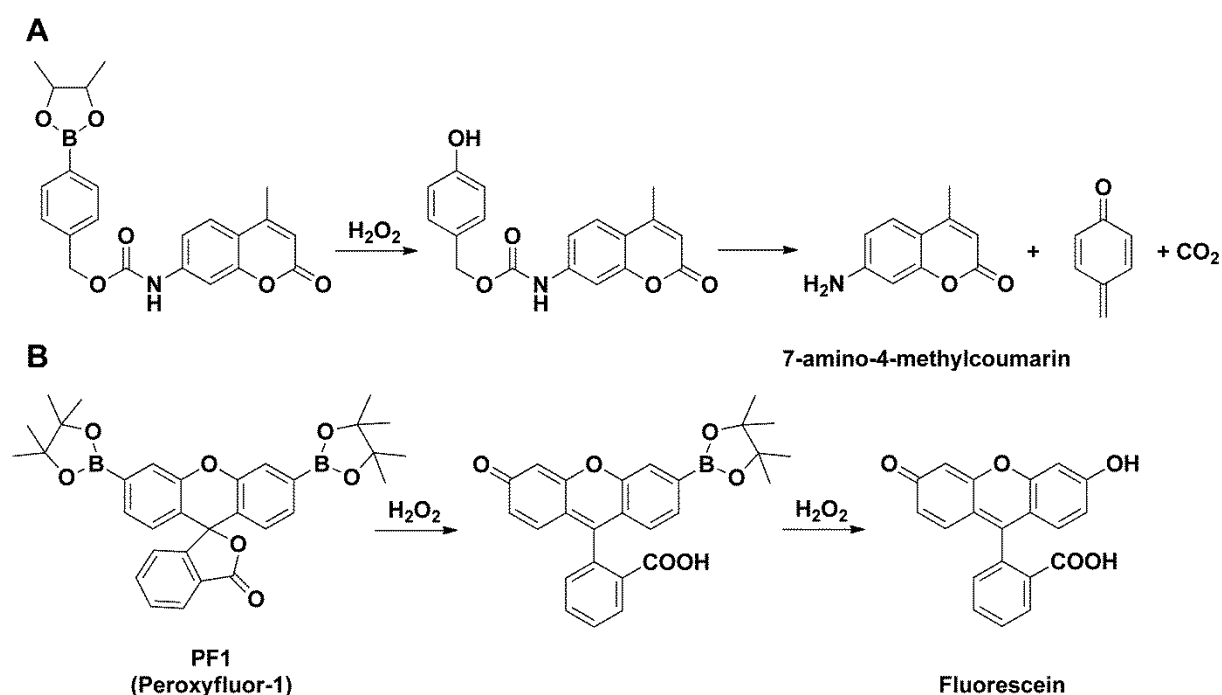
For all those reasons, in the field of redox biology there was an urgent need of probes that form a characteristic product by reacting rapidly and directly with **ONOO⁻**, rather than with its radical intermediates: **•NO₂** and **CO₃•⁻**.

Description of the scientific aim and the achievements of the listed scientific papers

In the series of papers selected for the basis of the habilitation thesis I have focused on the mechanisms of oxidative transformation of boronic acids and boronate-based fluorogenic probes, as well as Amplex Red, in the context of their application for the detection of hydrogen peroxide and peroxynitrite. The other part of my scientific investigations presented here is focused on the use of boronate-based fluorogenic probes in the studies on azanone (HNO) reactivity.

In the [**H1**] paper, we have studied the kinetics and mechanism of the oxidation of selected boronate compounds by hydrogen peroxide, hypochlorous acid and peroxynitrite at

pH 7.4. In the middle of the first decade of XXI century, a new class of fluorogenic probes for detection of hydrogen peroxide in biological systems has been developed, based on the oxidation of boronate derivatives of fluorescent dyes. The first fluorogenic boronate probe designed for H_2O_2 detection was *p*-dihydroxyborylbenzyloxycarbonyl derivative of 7-amino-4-methylcoumarin. Upon reaction with H_2O_2 the fluorescent aminocoumarin reporter is released (Scheme 2A). [11] In 2004, Chang *et al.* described the synthesis and properties of a diboronate derivative of fluorescein Peroxyfluor-1 (**PF1**) (Scheme 2B). [12] Upon reaction with hydrogen peroxide, those weakly fluorescent boronates are converted to strongly fluorescent products.



Scheme 2. Reaction of H_2O_2 with fluorogenic boronate probes: (A) *p*-dihydroxyborylbenzyloxycarbonyl derivative of 7-amino-4-methylcoumarin, (B) diboronate derivative of fluorescein Peroxyfluor-1 (PF1).

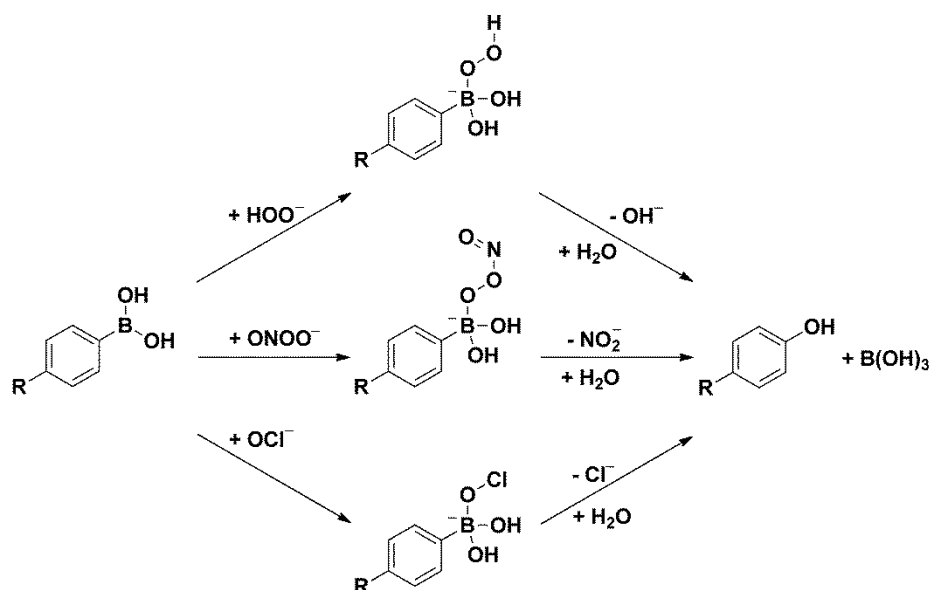
However, the analysis of the scientific literature on the chemical reactivity of boronic acids and boronate esters towards different oxidants indicated, that those compounds can be also oxidized to the corresponding phenols by other oxidants, e.g. the oxidation of phenylboronic acids by hypochlorite and hypobromite anions has been reported in the literature in 1962. [13] It was conceivable that several **ROS** and **RNS** possessing peroxide group may also react with boronates at physiological pH. For that reason, we have decided to

test those compounds as potential molecular probes for the detection of peroxynitrite and compare their reactivity towards **H₂O₂**, **OCI⁻** and **ONOO⁻**.

Alkyl- or arylboronates are organic compounds possessing a trivalent boron atom that has an alkyl or aryl substituent and two hydroxyl or ester groups. They are mild organic Lewis acids that can easily coordinate nucleophilic species. The pK_a value for most of arylboronic acids is in the range from 7 to 9, depending on the organic substituent. [14] Nucleophilic addition of peroxides to electron-deficient boronate functional group is a facile reaction and this property makes them effective probes for **ROS** and **RNS** detection in biological systems. Over 80 years ago, it was reported that **H₂O₂** reacts with boronate compounds in alkaline solution with the formation of the corresponding phenols. [15]

In the [H1] study, we have shown that peroxynitrite reacts directly and rapidly with boronic compounds yielding the corresponding hydroxyl derivatives (phenols or alcohols) as final products. We have measured the second-order rate constants for the reaction of boronate compounds with **ONOO⁻**, hypochlorous acid (**HOCl**), and hydrogen peroxide and we found that **ONOO⁻** reacts with boronic acids at pH 7.4 nearly a million times faster ($k \sim 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) than does **H₂O₂** ($k \sim 1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) and over 100 times faster than does **HOCl** ($k \sim 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). That high reactivity of boronic compounds toward peroxynitrite, compared with other oxidants studied, makes them attractive candidates as potential probes for imaging of cellular **ONOO⁻**. From product analyses and substrate consumption studies, we concluded that boronates react with peroxynitrite with a 1:1 stoichiometry, yielding the corresponding phenols as a major product ($\eta = 80\text{--}85\%$) and possibly free radical transient species and radical derived minor products ($\eta = 15\text{--}20\%$). Both, **HOCl** and **H₂O₂** react also stoichiometrically with boronates yielding the corresponding phenols ($\eta \sim 100\%$). We proposed a general mechanism of those reactions in which the oxidation occurs with the formation of the **ONOO⁻**, **OCI⁻** or **HOO⁻** adduct to the boronic functional group, which subsequently decomposes forming the phenolic product (Scheme 3).

The differences in the observed second-order rate constants for boronate oxidation by hydrogen peroxide, hypochlorous acid and peroxynitrite may be partially explained when taking into account the pK_a 's of **H₂O₂** (11.7), **HOCl** (7.47) and **ONOOH** (6.7). At physiological pH (~ 7.4), the percentage of anions directly reacting with boronates is 0.005, 46 and 83% for hydrogen peroxide, hypochlorous acid and peroxynitrite, respectively.



Scheme 3. Proposed mechanism of oxidation of boronic acids by hydrogen peroxide, hypochlorite and peroxyntirite.

We have also shown, that nitric oxide and superoxide together (forming peroxyntirite), but not alone, can oxidatively transform boronates into phenolic products. We also verified that nitrogen dioxide alone does not oxidize boronates to phenols.

We observed a nearly 100% conversion of the boronate to the corresponding phenolic product in the oxidation reactions with **H₂O₂** and **HOCl**. We did not observe any additional products in the reaction with **H₂O₂**, but higher concentrations of hypochlorous acid caused a rapid decrease in the observed yield of phenol, and we attributed that to the formation of the corresponding chlorinated product formed in the reaction of phenol with **HOCl**. In the case of peroxyntirite, the observed yield of the phenolic product was about 85%.

As the published reports on the reaction between **ONOO⁻** and carbonyl compounds or carbon dioxide indicate that the peroxyntirite adducts decompose on two pathways – nonradical and radical, [16,17] we proposed that a similar radical-mediated minor decomposition pathway occurs for the adduct of **ONOO⁻** anion to the boronic acid. That radical minor pathway of the boronates oxidation by peroxyntirite was described by us in details in the [H3] paper.

We concluded that the proposed mechanism of boronates reaction with **ONOO⁻**, **OCl⁻**, and **H₂O₂** should be quite general and could be applicable to many other boronates, including boronate-based profluorescent probes described already in the literature as selective probes for **H₂O₂**. Taking into account the rapid electrophilic reactions of **HOCl** with endogenous

amines and thiols, it is rather unlikely that the boronate-based probes can effectively compete for **HOCl** in the cellular systems. We suggested, that the results from our study may be helpful in developing a novel class of fluorescent probes for the detection and imaging of **ONOO⁻** in cellular and cell-free systems. The rapid and direct reaction between boronates and peroxynitrite, compared to hydrogen peroxide, makes them ideal candidates for fluorescent probes for peroxynitrite detection.

We also showed that nitrogen dioxide radical, formed from myeloperoxidase/**H₂O₂**-catalyzed oxidation of **NO₂⁻** anion, does not oxidize boronic acids to corresponding phenols, and therefore boronates can be used to unambiguously identify the species (**ONOO⁻** or **•NO₂**) responsible for the nitration of protein tyrosyl residues under nitrative stress conditions.

In the next paper ([H2]) we described the properties and chemical reactivity of coumarin-7-boronic acid (**CBA**). We showed that **CBA** reacts rapidly and stoichiometrically with peroxynitrite yielding fluorescent 7-hydroxycoumarin (**COH**) as the major product ($\eta = 81\%$). The observed reactivity of **CBA** towards **ONOO⁻** was similar to what had been published by us for simple arylboronates ([H1]). Using the stopped-flow kinetic technique, we determined the second-order rate constant for the reaction of **CBA** with **ONOO⁻** to be equal to $1.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Due to that high reactivity, the boronate probe **CBA** can effectively compete with the self-decomposition of peroxynitrite at neutral pH, even when present at low micromolar concentrations.

We showed that the **CBA** probe can efficiently scavenge **ONOO⁻** added as a bolus or formed from co-generated nitric oxide and superoxide radical anion, allowing for real-time monitoring of peroxynitrite formation. In our study on the detection of peroxynitrite formed from co-generated **•NO** and **O₂^{•-}** we also tested the effects of **SOD** (catalyzing superoxide dismutation to **H₂O₂** and **O₂**) and catalase (catalyzing **H₂O₂** decomposition to **O₂** and **H₂O**) on the yield of **COH** formation. We demonstrated the lack of a complete inhibition of **CBA** oxidation to **COH** by **SOD**, even in the presence of catalase. This observation can be explained by the competition between **•NO** and **SOD** for **O₂^{•-}**. We confirmed that explanation by the kinetic simulations of the inhibitory effects of **SOD**, done with the use of the *Kintecus* simulation software. The **SOD**-dependent degree of inhibition of **CBA** oxidation in the nitric oxide/superoxide generating system, was the same as the one observed experimentally.

Quantitative product analyses and substrate consumption data, presented in our studies [H1] and [H2], indicated that both **H₂O₂** and **HOCl** react with boronates directly and

stoichiometrically, yielding a single major phenolic product at close to 100% yield. In contrast, **ONOO⁻** reacted stoichiometrically with boronates, yielding the corresponding phenols as major products, but with the yield about 80–90%. The formation of other, minor products strongly suggested the involvement of the second, free radical pathway of peroxyxynitrite reaction with boronates, leading to the formation of phenoxyl, phenyl, and nitrogen dioxide radicals. In the [H3] paper, we investigated in detail that minor, free radical pathway of boronic acids reaction with **ONOO⁻**.

We used the electron paramagnetic resonance spin-trapping technique to characterize the free radical transient species formed in the reaction between boronates and peroxyxynitrite. Using two different spin traps: 2-methyl-2-nitrosopropane (**MNP**) and 5-diethoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrroline-N-oxide (**DEPMPO**), we trapped and detected phenyl radicals formed in the studied reaction. Although we were not able to trap and detect phenoxyl radicals (**PhO[•]**), the positive effects of molecular oxygen, and inhibitory effects of hydrogen atom donors (e.g. 2-propanol) and radical scavengers (**NADH**, **GSH**, ascorbic acid) on the formation of phenoxyl radical-derived nitrated products, suggested that the **PhO[•]** radical is formed as the secondary transient radical species. We also observed that the **EPR** signal intensities of radical adducts formed from trapping of the phenyl radicals increased with the maximum yield occurring at 1:1 ratio between the boronate and peroxyxynitrite. Spin-trapping experiments with aryl boronates and hydrogen peroxide did not show formation of any radical intermediates, in agreement with the proposal that in the reaction with **H₂O₂** boronate is converted to phenol with 100% yield in a two-electron oxidation process.

Based on those observations, we proposed the mechanism of boronate oxidation by peroxyxynitrite (Scheme 4). The initial step of the oxidation reaction is the nucleophilic addition of peroxyxynitrite anion to the electrophilic boron atom of boronate moiety in **PhB(OH)₂**. The anionic intermediate **PhB(OH)₂OONO⁻** undergoes both heterolytic (major pathway) and homolytic (minor pathway) cleavage of the **O-O** bond to form phenol and nitrite as the major products or the transient products of radical nature: **PhB(OH)₂O^{•-}** radical anion and **•NO₂** (as the minor products). The phenyl radical (**Ph[•]**) can be subsequently formed via the fragmentation of the **PhB(OH)₂O^{•-}** radical anion or its protonated form **PhB(OH)₃[•]**. The latter can be regarded as an adduct of the phenyl radical **Ph[•]** to boric acid **B(OH)₃** and is expected to be extremely unstable. According to the DFT quantum mechanical calculations, performed by us, the dissociation of that **PhB(OH)₃[•]** radical is barrierless, whereas the computed energy

We also proposed that the peroxynitrite-specific products formation profile of boronate oxidation, being a “peroxynitrite fingerprint”, may be used in chemical, enzymatic and cellular systems to confirm the formation of peroxynitrite, as other oxidants – H_2O_2 and HOCl – do not react with boronates with the formation free radical intermediates.

76

Mitochondria are considered as one of the major sources and targets of reactive oxygen and reactive nitrogen species within the cells. Superoxide radical anion, being a product of one-electron reduction of molecular oxygen, was proposed as a byproduct of mitochondrial respiration. This primary mitochondrial **ROS** can undergo dismutation to H_2O_2 (spontaneously or in reaction catalyzed by **SOD**) or react with nitric oxide to form peroxynitrite. ONOO^- formation inside mitochondria is very likely to occur, as $\cdot\text{NO}$ can diffuse easily into mitochondria.

First mitochondria-targeted boronate-based probe **MitoPY1** was reported in the literature in 2008 by Chang *et al.* [18] It was a weakly fluorescent boronate derivative of a hybrid fluorescein/rhodamine dye linked to a triphenylphosphonium group, responsible for the targeting of the probe to mitochondria.

The other mitochondria-targeted boronate-based molecular probe, (3-borono-benzyl)triphenylphosphonium bromide, called **MitoB**, was proposed by Murphy *et al.* in 2011 for *in vivo* measurements of mitochondrial hydrogen peroxide production in *Drosophila*. [19, 20] After administration to *Drosophila*, **MitoB** accumulated within mitochondria, where it was oxidized to the phenolic product (3-hydroxybenzyl)triphenylphosphonium (**MitoP**). The extent of **MitoB** oxidation was expressed as a ratio of **MitoP**/**MitoB** to correct for changes in the probe distribution.

In the [H4] study, we investigated the reaction of peroxynitrite with **MitoB** (*m*-MitoPhB(OH)₂) or its isomers (*o*-MitoPhB(OH)₂ and *p*-MitoPhB(OH)₂) to determine the influence of a proximity of bulky triphenylphosphonium group on the reaction kinetics and mechanism.

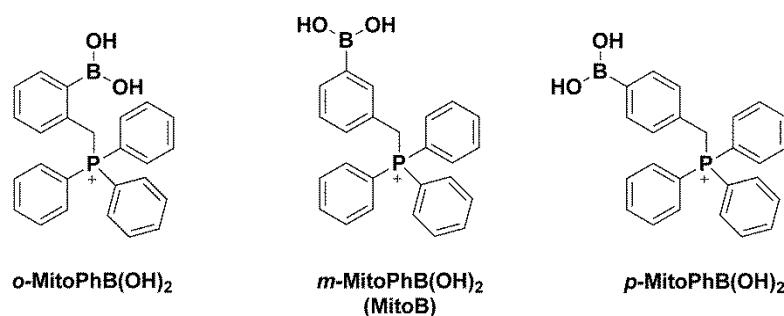


Figure 1. Structures of cations of isomeric *ortho*-, *meta*- and *para*-MitoPhB(OH)₂ probes.

We synthesized three isomeric mitochondria-targeted arylboronate probes: *p*-MitoPhB(OH)₂, *m*-MitoPhB(OH)₂ (**MitoB**) and *o*-MitoPhB(OH)₂, (Figure 1) as well as the expected minor products of their reaction with peroxynitrite: **MitoPh**, and *o*-, *m*-, and *p*-MitoPhNO₂.

Using a competition kinetic method and pulse radiolysis technique for **ONOO⁻** generation, we showed that **MitoB** (*m*-**MitoPhB(OH)₂**) and its *para*- and *ortho*- isomers react rapidly with peroxynitrite. We determined the rate constants values of the reaction of peroxynitrite with **MitoPhB(OH)₂** isomers at pH 7.4 to be equal to $(3.5 \pm 0.5) \times 10^5$, $(1.0 \pm 0.1) \times 10^6$, and $(1.0 \pm 0.1) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ for *ortho*, *meta*, and *para* isomers, respectively. We also determined, that all studied isomers react with peroxynitrite with the formation of additional, minor products *via* the radical pathway described previously ([H3]).

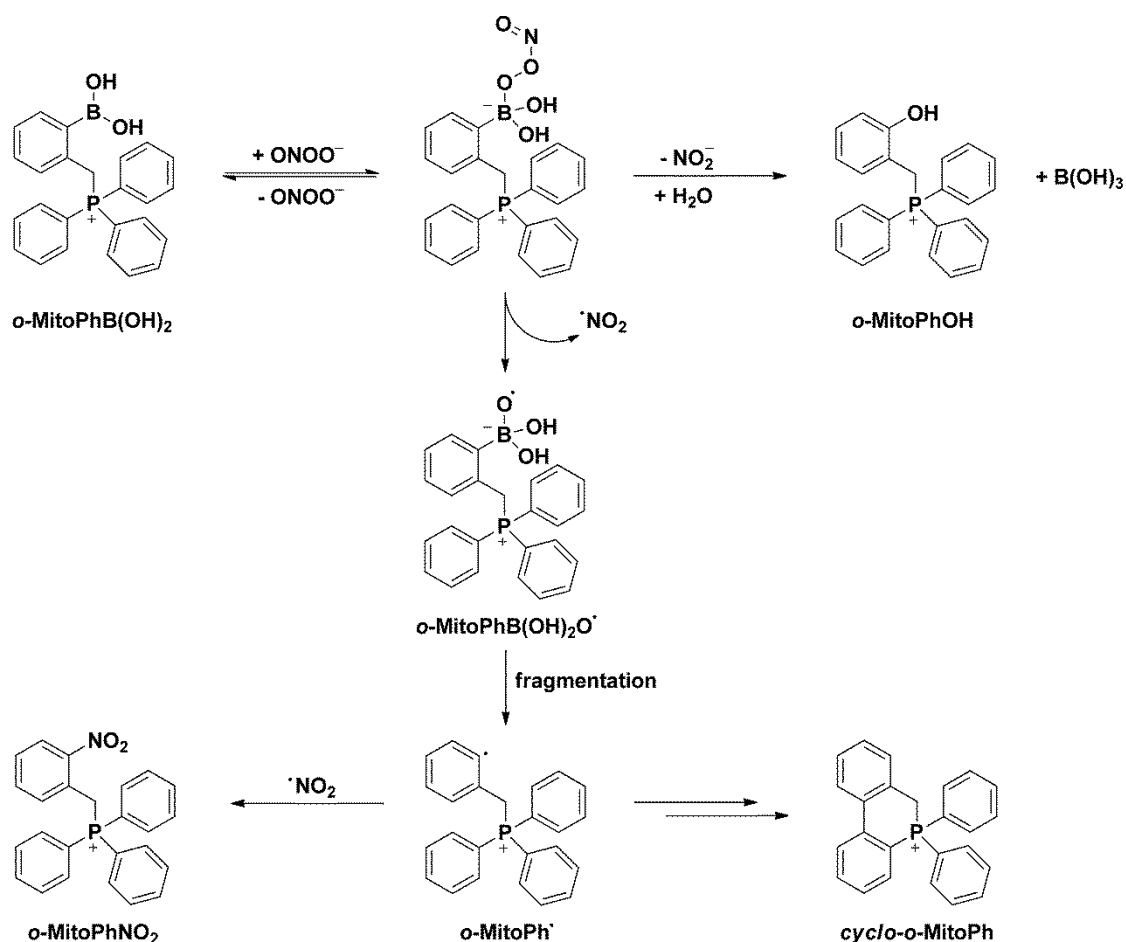
We used the electron paramagnetic resonance spin-trapping technique to characterize the phenyl radicals formed in the reaction of **MitoPhB(OH)₂** isomers with **ONOO⁻**. The results from the EPR spin-trapping experiments showed that *m*-**MitoPh[•]** and *p*-**MitoPh[•]** radicals formed from the reaction between **ONOO⁻** and *m*-**MitoPhB(OH)₂** or *p*-**MitoPhB(OH)₂** could be trapped with 2-methyl-2-nitrosopropane (**MNP**) and **DEPMPO** spin traps to give characteristic EPR spectra of the corresponding phenyl radical adducts. Results from that investigation unequivocally confirmed the formation of a phenyl radical intermediates from *meta* and *para* isomers, but not from the *ortho* isomer.

We also investigated the products formation profiles of the reactions of **ONOO⁻** with **MitoPhB(OH)₂** isomers in the presence of phenyl radical scavenger 2-propanol. The performed HPLC analyses showed that the major products of **MitoPhB(OH)₂** oxidation by peroxynitrite, in the case of all three isomers, are the corresponding phenols (~ 90% yield). Interestingly the relative yields of the minor products formed in the reaction of peroxynitrite with **MitoPhB(OH)₂** are different. We showed, that with *para* and *meta* isomers, the dominant minor product formed from the radical pathway in the presence of 10% 2-PrOH, being an effective phenyl radical scavenger, is **MitoPh**, which is formed by a hydrogen atom abstraction from **2-PrOH** by **MitoPh[•]** radicals. With the *ortho* isomer, the yield of **MitoPh** is much lower.

The performed DFT quantum mechanical calculations indicated that the energy barrier for the fragmentation of the *o*-**MitoPhB(OH)₂O^{•-}** radical anion is significantly lower than that of *m*-**MitoPhB(OH)₂O^{•-}** and *p*-**MitoPhB(OH)₂O^{•-}** radical anions.

In the [H4] paper, we proposed a rapid fragmentation of the *o*-**MitoPhB(OH)₂O^{•-}** radical anion with subsequent reaction of the resulting phenyl radical with **[•]NO₂** in the solvent cage. Our further, detailed investigation of the products formed in the reaction the *ortho*- isomer and peroxynitrite (presented in the [B13] paper), performed with the use of LC-MS/MS

system, showed that the transient phenyl radical ***o*-MitoPh[•]** undergoes rapid intramolecular cyclization to form a peroxynitrite-specific ***cyclo-o*-MitoPh** product (9,10-dihydro-9,9-diphenyl-9-phosphoniaphenanthrene) (Scheme 5). The determined yields of the minor, peroxynitrite-specific products: ***cyclo-o*-MitoPh** and ***o*-MitoPhNO₂** formed from the reaction of ***o*-MitoPhB(OH)₂** reaction with peroxynitrite are equal to $10.5 \pm 0.5\%$ and $0.5 \pm 0.1\%$, respectively.



Scheme 5. Mechanism of the reaction of *o*-MitoPhB(OH)₂ with peroxynitrite.

We also showed, that the formation of oxidizing and nitrating radicals formed from the reaction between peroxynitrite and *ortho* isomer is minimal, which leads e.g. to an effective attenuation of peroxynitrite-derived tyrosine nitration.

As with simple arylboronates, the adduct of peroxynitrite to the electrophilic boron atom of boronate moiety decays on two pathways: *via* heterolytic cleavage of the **O–O** bond (the major pathway) leading to the formation of the corresponding phenol and **NO₂⁻** and *via*

homolytic cleavage of the **O–O** bond (minor pathway) resulting in the formation of the radical anion, **MitoPhB(OH)₂O^{•-}**, and nitrogen dioxide.

Quantitation of the peroxynitrite-derived oxidation products formed from **MitoPhB(OH)₂** isomers also allowed us to get insight into relative kinetics of the nonradical and radical pathways. The ratio of the rate constants of the radical and nonradical pathway $k_{\text{rad}}/k_{\text{nonrad}}$ can be estimated from the plot of sum of the minor products versus the amount of major product. The determined values of those ratios are equal to these ratios equal 0.1, 0.1, and 0.07 for *ortho*, *meta*, and *para* isomers, respectively.

In the next paper [H5], we focused on the investigation of the chemical identity of the product of the reaction of **HNO** with molecular oxygen in aqueous solutions at physiological pH. **HNO**, commonly known as nitroxyl (IUPAC recommended name: azanone), formally is the protonated product of one-electron reduction of nitric oxide. This reactive, small triatomic molecule remains an enigmatic reactive nitrogen species, and its chemical reactivity and biological activity are still not completely understood.

The ground state of azanone is a singlet, but its anion (**NO⁻**), similarly to the isoelectronic diatomic oxygen molecule, has the triplet ground state. **HNO** is a very weak acid ($\text{p}K_{\text{a}} \sim 11.4$), [21] and its deprotonation, as a spin-forbidden reaction is a rather slow process: the rate constant of the reaction of **HNO** with **OH⁻** anions is equal to $4.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. [21].

One of the most interesting aspects of azanone (**HNO/NO⁻**) chemistry was its reaction with molecular oxygen. It has been reported in the literature that **NO⁻** anion reacts rapidly with molecular oxygen ($k = 2.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [21] forming peroxynitrite (reaction 7). [21, 22]



Despite numerous studies on the reaction of **HNO** with molecular oxygen, the chemical identity of the oxidant that is formed in the reaction has not been unequivocally established. [23-25] The possibility of peroxynitrite formation from the reaction between azanone and molecular oxygen at physiological pH has been questioned. [23, 25] This was, in part, due to the lack of appropriate chemical probes that would directly react with peroxynitrite with the formation of peroxynitrite-specific products. In the [H5] paper we presented unambiguous evidence for peroxynitrite formation in the process of **HNO** oxidation by molecular oxygen. For that purpose, we applied the recently developed assays for specific detection and quantification of peroxynitrite.

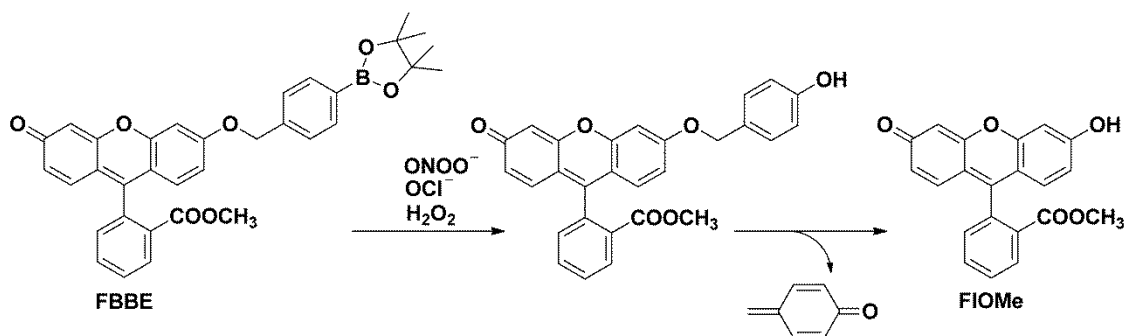
We have detected and quantified peroxynitrite formed in aerated aqueous solutions of Angeli's salt, an azanone donor. For that purpose, we used the fluorogenic boronate probe **CBA** (characterized previously in paper [H2]) and we showed that in addition to the major phenolic product 7-hydroxycoumarin (**COH**), there is also the formation of peroxynitrite-specific minor products coumarin (**CH**) and 7-nitrocoumarin (**CNO₂**).

Next, we used the competition kinetics method and a set of azanone scavengers of known reactivity to determine the value of the second order rate constant of the **HNO** reaction with **O₂**. The rate constant for the reaction of azanone with molecular oxygen was determined to be equal to $(1.8 \pm 0.3) \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ at pH 7.4. This value is two times higher than previously reported by Liochev and Fridovich ($k = 8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [26] and approximately five times higher than the value proposed by Miranda *et al.* ($k = 3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). [27]

While the main achievement of this paper was the identification of the chemical nature of the oxidizing species formed in the reaction of **HNO** with **O₂**, we also reported the development of a simple kinetic method for the studies on the chemical reactivity of azanone. In the paper discussed here, we used this methodology to study the reactivity of **HNO** towards selected thiols of possible biological and/or pharmacological relevance. We determined the values of the rate constants of the reactions of **HNO** with cysteine [$(4.5 \pm 0.9) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$], glutathione [$(3.1 \pm 0.6) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$], dithiothreitol [$(2.8 \pm 0.7) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$], N-acetylcysteine [$(1.4 \pm 0.3) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$], captopril [$(0.6 \pm 0.1) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$], bovine and human serum albumins [$(1.4 \pm 0.4) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$], and **HS⁻** [$(1.2 \pm 0.3) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$].

Based on those results we concluded that it is very unlikely that **HNO** would react with **O₂** in the intracellular milieu, because of the high content of reduced thiols (both low-molecular and proteins) and relatively low concentration of molecular oxygen.

Paper [H6] focused on the characterization of a fluorescein-based monoboronate probe, a 4-(pinacol boronate)benzyl derivative of fluorescein methyl ester (**FBBE**). The mechanism of its oxidation is presented at scheme 6.



Scheme 6. Mechanism of oxidative transformation of FBBE probe in the reaction with hydrogen peroxide, OCl^- and peroxynitrite.

We studied the reactivity of **FBBE** fluorogenic probe toward peroxynitrite as well hypochlorite, hydrogen peroxide, and tyrosyl hydroperoxide. We determined the second-order rate constants of the reactions of **FBBE** with peroxynitrite, **HOCl**, and **H₂O₂** at pH 7.4 to be equal to $(2.8 \pm 0.2) \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $(8.6 \pm 0.5) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, and $(0.96 \pm 0.03) \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectively.

We also studied the effect of glutathione (**GSH**) on the oxidative conversion of **FBBE** by different **ROS** and **RNS**. We showed, that the presence of glutathione completely blocks the oxidation of the probe by **HOCl** and significantly inhibits its oxidation by **H₂O₂** and tyrosyl hydroperoxide but not by peroxynitrite. We concluded, that the selectivity of **FBBE** and other boronate probes toward **ONOO⁻** should be increased in cellular milieu due to the presence of glutathione and other thiols, which effectively scavenge hydrogen peroxide and other hydroperoxides.

As a proof of the concept of the usefulness of the **FBBE** fluorogenic probe for the detection of peroxynitrite in biological systems, we analyzed **FBBE** oxidation in **Ea.hy926** endothelial cells stimulated to produce **ROS** and/or **RNS** using doxorubicin. We showed that the incubation of **Ea.hy926** endothelial cells with doxorubicin led to **FBBE** oxidative transformation resulting in the increase in green fluorescence, which was inhibited by **L-NAME** and by **PEG-SOD** but not by **PEG-catalase**. This was consistent with doxorubicin-induced peroxynitrite production.

In the paper [H7] we investigated the mechanism of one-electron oxidation of Amplex Red (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine) and we presented the spectroscopic characterization of transient species formed upon its one-electron oxidation. Amplex Red is a colorless and non-fluorescent compound being a fluorogenic probe widely used for the

Amplex Red
 (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine)

Resorufin



We characterized two transient species formed during the conversion of Amplex Red into resorufin and determined the reactivity of the probe toward selected one-electron oxidants. The results of our study indicated that one-electron oxidation of Amplex Red leads to the formation of resorufin as a final product, through the spontaneous disproportionation of Amplex Red-derived radical species with subsequent hydrolysis of the transient N-acetylresorufin (Scheme 8).



We showed that carbonate radical anion ($\text{CO}_3^{\bullet-}$), being peroxynitrite-derived strong one-electron oxidant, can oxidize Amplex Red with high second-order rate constant [$k = (7.6 \pm 0.3) 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, at pH 10.3]. We also determined the reactivity of Amplex Red toward azidyl radical ($\text{N}_3^{\bullet}$) at pH 7.2 [$k = 2.1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$]. As the reduction potential of $\text{N}_3^{\bullet}$ is 0.3 V lower than of $\text{CO}_3^{\bullet-}$, we hypothesized that $\text{CO}_3^{\bullet-}$ also is able to effectively oxidize the probe at physiological pH. We estimated the value of one-electron reduction potential of Amplex Red radical to be equal to 1.14 V.

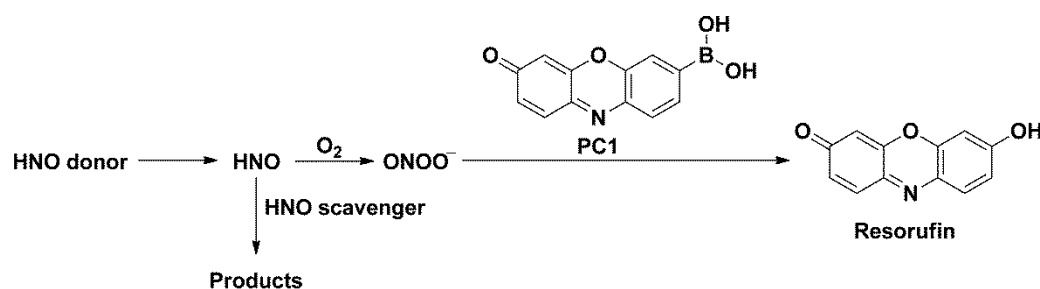
In the [H7] paper we also demonstrated, that peroxynitrite is able to oxidize Amplex Red to resorufin, *via* the formation of transient radicals, or in the reaction catalyzed by horseradish peroxidase. This observation was consistent with the several scientific papers reporting **HRP**-catalyzed oxidation of phenolic compounds by peroxynitrite and with our previous observations on Amplex Red oxidation by co-generated fluxes of nitric oxide and superoxide in the presence and absence of **HRP** (paper [B8]).

The main practical conclusion of this investigation is that the results obtained with Amplex Red/ H_2O_2 /**HRP** assay may overestimate the amount of hydrogen peroxide if peroxynitrite is also produced in the investigated system. We postulated, that the proper identification of the oxidant requires additional controls with the use of appropriate scavengers e.g. catalase for H_2O_2 and boronate for ONOO^- to establish the contribution of both oxidants to the total signal detected.

We also tested the effects of glutathione on the yield of resorufin in **HRP**-catalyzed oxidation of Amplex Red by hydrogen peroxide, and observed concentration-dependent inhibition of resorufin formation. We showed that the combination of **CBA** fluorogenic probe with Amplex Red and **HRP** can be used for simultaneous determination of the amounts of hydrogen peroxide and peroxynitrite.

The [H8] paper is a kinetic study on the reactivity of azanone (**HNO**) toward selected scavengers. In this study, we applied the competition kinetics method, developed and described in the [H5] paper, to determine the rate constants for the reactions of **HNO** with its selected scavengers. The kinetic method applied is based on two parallel **HNO** reactions: one with the studied scavenger and the other with molecular oxygen [$k = (1.8 \pm 0.3) \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$], leading to the formation of peroxynitrite, that was detected fluorometrically with the use of fluorogenic boronate probe **PC1**. In this study we used two **HNO** donors – Angeli's salt and 2-bromo-*N*-hydroxybenzenesulfonamide (2-bromo substituted Piloty's acid, **2-BrPA**)

to generate azanone. A reaction model illustrating the competition kinetic method is presented in Scheme 9.



Scheme 9. Reaction model used for the determination of the rate constants of HNO reactions with its scavengers.

Although during the last twenty years there has been tremendous progress in understanding azanone chemistry and chemical biology, **HNO** remains the most elusive reactive nitrogen species and the kinetics of its reactions is largely unexplored, mainly due to the lack of appropriate kinetic methods. In the [H8] paper we reported the second order rate constants for the reactions of **HNO** with nitrite ($k = (5.0 \pm 0.9) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), hydroxylamine ($k = (2.1 \pm 0.4) \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), sulfite ($k = (1.2 \pm 0.2) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), thiosulfate ($k = (2.2 \pm 0.7) \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), benzenesulfinate ($k = (4.4 \pm 0.9) \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), 2-bromobenzenesulfinate ($k = (5.0 \pm 1.2) \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), S-nitrosoglutathione ($k = (2.4 \pm 0.7) \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), nitrosobenzene ($k > 1.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), 2-nitroso-1-naphthol ($k = (1.0 \pm 0.2) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), triphenylphosphine ($k > 7.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), triphenylphosphine-3,3',3''-trisulfonate ($k = (3.0 \pm 0.5) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), tris-carboxyethylphosphine ($k = (1.2 \pm 0.3) \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), a triphenylphosphine-based **P-CM** fluorogenic probe ($k > 1.2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), the **TEMPO-9-AC** fluorogenic probe ($k = (9 \pm 2) \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) and 4-acetamido-**TEMPO** ($k = (8 \pm 2) \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

The results of our kinetic studies confirmed that C-nitroso compounds and phosphine-based probes can be successfully used for **HNO** detection in simple chemical or enzymatic systems. However, in cells, thiols are likely to be the main target of azanone, due to their relatively high intracellular concentrations and the high values of the rate constants [H5].

The paper [H9] is a review article summarizing the synthetic chemistry strategies to target compounds to mitochondria, describing reported mitochondrial probes and sensors, and presenting examples of mitochondria-targeted bioactive compounds.

Mitochondria are recognized as one of the most important targets for new drug design in cancer, cardiovascular, and neurological diseases, as well as one of the major sources and targets of reactive oxygen and nitrogen species within cells. In this Review, we summarized reported studies on targeting small-molecule compounds to mitochondria for probing and modulating mitochondria functions. We discussed the physicochemical basis for mitochondrial accumulation of lipophilic cations, used synthetic strategies, mitochondrial probes, and sensors, and examples of mitochondrial targeting of bioactive compounds. We also presented review of reported attempts to apply mitochondria-targeted agents for the treatment of cancer and neurodegenerative diseases.

The paper [H10] is a review article prepared for the special issue of *Free Radical Biology and Medicine* journal entitled *Current fluorescence and chemiluminescence approaches in free radical and redox biology*. In this review, we summarized and discussed the properties and chemical mechanisms of action of fluorescent probes that can be used for **HNO** detection.

Despite more than decade of extensive studies on the development of the methodologies of **HNO** detection, it still remains the most elusive reactive nitrogen species, and its selective detection remains a challenge. Over the last years, there has been a real progress in the development of low-molecular-weight fluorogenic probes for the detection of **HNO**, and therefore, in this review, we focused on the challenges, limitations and perspectives on azanone detection based on the use of such probes.

The paper [H11] is a kinetic study on **HNO** liberation from Piloty's acid derivatives. In this study we used an indirect method of azanone detection, based on the peroxyxynitrite quantitation, that is formed in the reaction of **HNO** with molecular oxygen. We have characterized the kinetics of the decomposition of three *ortho*-substituted derivatives of Piloty's acid: 2-bromo-, 2-chloro- and 2-trifluoromethyl-N-hydroxybenzenesulfonamide (**2-BrPA**, **2-ClPA**, and **2-CF₃PA**). We have shown, that the decomposition of those **HNO** donors highly depends on pH of the solution. We have also determined the activation energies of azanone liberation from **HNO** donors studied and the determined values are equal to 98 ± 3 , 96 ± 1 and 88 ± 2 kJ/mol for **2-ClPA**, **2-BrPA** and **2-CF₃PA**, respectively.

To enhance the solubility of **2-BrPA** in water, we prepared the complex of this donor with sodium salt of β -cyclodextrin sulfobutyl ethers-ethyl ethers. We have shown that the kinetics of **HNO** release from such complex is very similar to the kinetics of **HNO** release from **2-BrPA**.

In the [H11] paper, we have also presented results from quantum mechanical calculations, performed to characterize the transition states for **HNO** release from the studied N-hydroxybenzenesulfonamide anions. With the use of confocal microscopy we have also studied *in vivo* antithrombotic activity of two different **HNO** donors with similar kinetics of **HNO** release: **2-BrPA** and Angeli's salt.

References:

- [1] P. Wardman, *Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects*, Free Radic. Biol. Med. **43** (2007) 995–1022.
- [2] B. Kalyanaraman, V. Darley-Usmar, K.J. Davies, P.A. Dennerly, H.J. Forman, M.B. Grisham, G.E. Mann, K. Moore, L.J. Roberts, 2nd, H. Ischiropoulos, *Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations*, Free Radic. Biol. Med. **52** (2012) 1–6.
- [3] G. Ferrer-Sueta, N. Campolo, M. Trujillo, S. Bartsaghi, S. Carballal, N. Romero, B. Alvarez, R. Radi, *Biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration*, Chem. Rev. **118** (2018) 1338–1408.
- [4] W.H. Koppenol, J.J. Moreno, W.A. Pryor, H. Ischiropoulos, J.S. Beckman, *Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide*, Chem. Res. Toxicol. **5** (1992) 834–42.
- [5] J.S. Beckman, T.W. Beckman, J. Chen, P.A. Marshall, B.A. Freeman, *Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide*, PNAS **87** (1990) 1620–4.
- [6] A. Denicola, B.A. Freeman, M. Trujillo, R. Radi, *Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations*, Arch. Biochem. Biophys. **333** (1996) 49–58.
- [7] O. Augusto, M.G. Bonini, A.M. Amanso, E. Linares, C.C. Santos, S.L. De Menezes, *Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology*, Free Radic. Biol. Med. **32** (2002) 841–59.
- [8] M. Wrona, K. Patel, P. Wardman, *Reactivity of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 and their oxidized forms toward carbonate, nitrogen dioxide, and hydroxyl radicals*, Free Radic. Biol. Med. **38** (2005) 262–270.
- [9] M. Wrona, K.B. Patel, P. Wardman, *The roles of thiol-derived radicals in the use of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein as a probe for oxidative stress*, Free Radic. Biol. Med. **44** (2008) 56–62.
- [10] L.K. Folkes, K.B. Patel, P. Wardman, M. Wrona, *Kinetics of reaction of nitrogen dioxide with dihydrorhodamine and the reaction of the dihydrorhodamine radical with oxygen: implications for quantifying peroxynitrite formation in cells*, Arch. Biochem. Biophys. **484** (2009) 122–6.
- [11] L.C. Lo, C.Y. Chu, *Development of highly selective and sensitive probes for hydrogen peroxide*, Chem. Comm. (2003) 2728–9.

- [12] M.C. Chang, A. Pralle, E.Y. Isacoff, C.J. Chang, *A selective, cell-permeable optical probe for hydrogen peroxide in living cells*, J. Am. Chem. Soc. **126** (2004) 15392–3.
- [13] H.G. Kuivila, L.E. Benjamin, C.J. Murphy, A.D. Price, J.H. Polevy, *Electrophilic displacement reactions. XIV. Two novel reactions involving areneboronic acids and halogens*, J. Org. Chem. **27** (1962) 825–829.
- [14] *Boronic acids: preparation and applications in organic synthesis, medicine and materials*, Edited by D.G. Hall, Wiley–VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2005
- [15] A.D. Ainley, F. Challenger, *Studies of the boron-carbon linkage. Part I. The oxidation and nitration of phenylboric acid*, J. Chem. Soc. (1930) 2171–2180.
- [16] R.M. Uppu, G.W. Winston, W.A. Pryor, *Reactions of peroxyxynitrite with aldehydes as probes for the reactive intermediates responsible for biological nitration*, Chem. Res. Toxicol. **10** (1997) 1331–7.
- [17] G. Merenyi, J. Lind, S. Goldstein, *The rate of homolysis of adducts of peroxyxynitrite to the C=O double bond*, J. Am. Chem. Soc. **124** (2002) 40–8.
- [18] B.C. Dickinson, C.J. Chang, *A targetable fluorescent probe for imaging hydrogen peroxide in the mitochondria of living cells*, J. Am. Chem. Soc. **130** (2008) 9638–9.
- [19] H.M. Cocheme, C. Quin, S.J. McQuaker, F. Cabreiro, A. Logan, T.A. Prime, I. Abakumova, J.V. Patel, I.M. Fearnley, A.M. James, C.M. Porteous, R.A. Smith, S. Saeed, J.E. Carre, M. Singer, D. Gems, R.C. Hartley, L. Partridge, M.P. Murphy, *Measurement of H₂O₂ within living Drosophila during aging using a ratiometric mass spectrometry probe targeted to the mitochondrial matrix*, Cell Metab. **13** (2011) 340–50.
- [20] H.M. Cocheme, A. Logan, T.A. Prime, I. Abakumova, C. Quin, S.J. McQuaker, J.V. Patel, I.M. Fearnley, A.M. James, C.M. Porteous, R.A. Smith, R.C. Hartley, L. Partridge, M.P. Murphy, *Using the mitochondria-targeted ratiometric mass spectrometry probe MitoB to measure H₂O₂ in living Drosophila*, Nat. Protoc. **7** (2012) 946–58.
- [21] V. Shafirovich, S.V. Lyman, *Nitroxyl and its anion in aqueous solutions: spin states, protic equilibria, and reactivities toward oxygen and nitric oxide*, PNAS **99** (2002) 7340–5.
- [22] C.E. Donald, M.N. Hughes, J.M. Thompson, F.T. Bonner, *Photolysis of the nitrogen-nitrogen double bond in trioxodinitrate: reaction between triplet oxonitrate(1-) and molecular oxygen to form peroxyxynitrite*, Inorg. Chem. **25** (1986) 2676–2677.
- [23] K.M. Miranda, M.G. Espey, K. Yamada, M. Krishna, N. Ludwick, S. Kim, D. Jour'dheuil, M.B. Grisham, M. Feelisch, J.M. Fukuto, D.A. Wink, *Unique oxidative mechanisms for the reactive nitrogen oxide species, nitroxyl anion*, J. Biol. Chem. **276** (2001) 1720–7.
- [24] M. Kirsch, H. de Groot, *Formation of peroxyxynitrite from reaction of nitroxyl anion with molecular oxygen*, J. Biol. Chem. **277** (2002) 13379–88.
- [25] K.M. Miranda, K. Yamada, M.G. Espey, D.D. Thomas, W. DeGraff, J.B. Mitchell, M.C. Krishna, C.A. Colton, D.A. Wink, *Further evidence for distinct reactive intermediates from nitroxyl and peroxyxynitrite: effects of buffer composition on the chemistry of Angeli's salt and synthetic peroxyxynitrite*, Arch. Biochem. Biophys. **401** (2002) 134–44.

[26] S.I. Liochev, I. Fridovich, *The mode of decomposition of Angeli's salt ($\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_3$) and the effects thereon of oxygen, nitrite, superoxide dismutase, and glutathione*, Free Radic. Biol. Med. **34** (2003) 1399–404.

[27] K.M. Miranda, N. Paolocci, T. Katori, D.D. Thomas, E. Ford, M.D. Bartberger, M.G. Espey, D.A. Kass, M. Feelisch, J.M. Fukuto, D.A. Wink, *A biochemical rationale for the discrete behavior of nitroxyl and nitric oxide in the cardiovascular system*, PNAS **100** (2003) 9196–201.

15.02.2019 r.

ASikora

6. Other scientific achievements

6.1. Publications

Before PhD defense (6 papers)

A1. 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. **163** (2004) 373–379. IF₂₀₀₄ = **2.235**, my contribution = **10%**, number of citations: **11**

My contribution to this paper consisted of involvement in the part of the experiments on the radiolysis of low-temperature matrices.

A2. M. Czerwinska, A. Sikora, P. Szajerski, J. Adamus, A. Marcinek, J. Gebicki, P. Bednarek, *Mechanistic aspects of alloxan diabetogenic activity: a key role of keto-enol inversion of dialuric acid on ionization*, J. Phys. Chem. A **110** (2006) 7272–8. IF₂₀₀₆ = **3.047**, my contribution = **15%**, number of citations: **6**

My contribution to this paper consisted of involvement in the part of the experiments on the radiolysis of low-temperature matrices.

A3. M. Czerwinska, 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. **71** (2006) 5312–9. IF₂₀₀₆ = **3.790**, my contribution = **15%**, number of citations: **14**

My contribution to this paper consisted of involvement in the part of the experiments on the radiolysis of low-temperature matrices.

A4. P. Szajerski, J. Zielonka, A. Sikora, J. Adamus, A. Marcinek, J. Gebicki, V.I. Kozlovski, L. Drelicharz, S. Chlopicki, *Radical scavenging and NO-releasing properties of selected beta-adrenoreceptor antagonists*, Free Radic. Res. **40** (2006) 741–52. IF₂₀₀₆ = **2.536**, my contribution = **10%**, number of citations: **10**

My contribution to this paper consisted of running of part of the pulse radiolysis experiments.

A5. K. Piech, T. Bally, A. Sikora, A. Marcinek, *Mechanistic aspects of the oxidative and reductive fragmentation of N-nitrosoamines: a new method for generating nitrenium cations, amide anions, and aminyl radicals*, J. Am. Chem. Soc. **129** (2007) 3211–7. IF₂₀₀₇ = **7.885**, my contribution = **15%**, number of citations: **17**

My contribution to this paper consisted of involvement in the part of DFT calculations, scientific consultations and revision of the final manuscript.

A6. A. Sikora, J. Adamus, A. Marcinek, *Disproportionation of clozapine radical: a link between one-electron oxidation of clozapine and formation of its nitrenium cation*, Chem. Res. Toxicol. **20** (2007) 1093–8. IF₂₀₀₇ = **3.508**, my contribution = **60%**, number of citations: **15**

My contribution to this paper consisted of concept of this study, design and running of most of the experiments, analysis and discussion of the results, and the involvement in preparation of the manuscript.

After receiving PhD degree (18 papers)

B1. A. Sikora, P. Szajerski, L. Piotrowski, J. Zielonka, J. Adamus, A. Marcinek, J. Gebicki, *Radical scavenging properties of nicotinamide and its metabolites*, Rad. Phys. Chem. **77** (2008) 259–266. IF₂₀₀₈ = **0.882**, my contribution = **50%**, number of citations: **6**

My contribution to this paper consisted of running of part of the pulse radiolysis experiments.

B2. H. Zhang, J. Zielonka, A. Sikora, J. Joseph, Y. Xu, B. Kalyanaraman, *The effect of neighboring methionine residue on tyrosine nitration and oxidation in peptides treated with MPO, H₂O₂, and NO₂(-) or peroxynitrite and bicarbonate: role of intramolecular electron transfer mechanism?*, Arch. Biochem. Biophys. **484** (2009) 134–45. IF₂₀₀₉ = **3.046**, my contribution = **15%**, number of citations: **17**

My contribution to this paper consisted of involvement in running of a part of the experiments, analysis and discussion of the results, and the involvement in preparation of the manuscript.

B3. A. Bloch-Mechkour, T. Bally, A. Sikora, R. Michalski, A. Marcinek, J. Gebicki, *Radicals and radical ions derived from indole, indole-3-carbinol and diindolylmethane*, J. Phys. Chem. A **114** (2010) 6787–94. IF₂₀₁₀ = **2.732**, my contribution = **15%**, number of citations: **6**

My contribution to this paper consisted of involvement in pulse radiolysis experiments, the radiolysis of low-temperature organic glasses, and analysis and discussion of the results.

B4. R. Michalski, A. Sikora, J. Adamus, A. Marcinek, *Dihalide and pseudohalide radical anions as oxidizing agents in nonaqueous solvents*, J. Phys. Chem. A **114** (2010) 861–6. IF₂₀₁₀ = **2.732**, my contribution = **25%**, number of citations: **16**

My contribution to this paper consisted of concept of this study, involvement in the part of pulse radiolysis experiments, the radiolysis of low-temperature organic glasses, and analysis and discussion of the results.

B5. R. Michalski, A. Sikora, J. Adamus, A. Marcinek, *Mechanistic aspects of radiation-induced oligomerization of 3,4-ethylenedioxythiophene in ionic liquids*, J. Phys. Chem. A **114** (2010) 11552–9. IF₂₀₁₀ = **2.732**, my contribution = **25%**, number of citations: **2**

My contribution to this paper consisted of concept of this study and involvement in the radiolysis of low-temperature organic glasses, analysis and discussion of the results.

B6. J. Zielonka, A. Sikora, J. Joseph, B. Kalyanaraman, *Reply to Jourdain: Peroxynitrite is the major species formed from different flux ratios of co-generated nitric oxide and superoxide*, J. Biol. Chem. **285** (2010) 1e16. IF₂₀₁₀ = **5.328**, my contribution = **30%**, number of citations: **2**

My contribution consisted of scientific consultations and revision of the final manuscript.

B7. J. Zielonka, A. Sikora, M. Hardy, J. Joseph, B. P. Dranka, B. Kalyanaraman, *Boronate probes as diagnostic tools for real time monitoring of peroxynitrite and hydroperoxides*, Chem. Res. Toxicol. **25** (2012) 1793–9. IF₂₀₁₂ = **3.667**, my contribution = **15%**, number of citations: **99**

My contribution consisted of scientific consultations and revision of the final manuscript.

B8. 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. **287** (2012) 2984–95.

IF₂₀₁₂ = 4.651, my contribution = **15%**, number of citations: **95**

My contribution consisted of scientific consultations, discussion of the results and revision of the final manuscript.

B9. J. Zielonka, J. Joseph, A. Sikora, B. Kalyanaraman, *Real-time monitoring of reactive oxygen and nitrogen species in a multiwell plate using the diagnostic marker products of specific probes*, Methods Enzymol. **526** (2013) 145–57. **IF₂₀₁₃ = 2.194**, my contribution = **20%**, number of citations: **15**

My contribution consisted of scientific consultations, discussion of the results and revision of the final manuscript.

B10. M. Jakubowska, J. Adamus, J. Gebicki, A. Marcinek, A. Sikora, *Pulse radiolysis and spectrophotometric studies on the binding of organic cations with heparin*, Rad. Phys. Chem. **99** (2014) 6–11. **IF₂₀₁₄ = 1.380**, my contribution = **30%**, number of citations: **5**

My contribution to this paper consisted of concept of this study, involvement in analysis and discussion of the results and writing the final version of the manuscript.

B11. 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. **67** (2014) 278–84. **IF₂₀₁₄ = 5.736**, my contribution = **10%**, number of citations: **26**

My contribution consisted of scientific consultations, discussion of the results and revision of the final manuscript.

B12. J. Zielonka, A. Sikora, J. Adamus, B. Kalyanaraman, *Detection and differentiation between peroxynitrite and hydroperoxides using mitochondria-targeted arylboronic acid*, Methods Mol. Biol. **1264** (2015) 171–81, my contribution = **20%**, number of citations: **12**

My contribution consisted of scientific consultations, discussion of the results and revision of the final manuscript.

B13. J. Zielonka, M. Zielonka, L. VerPlank, G. Cheng, M. Hardy, O. Ouari, M. M. Ayhan, R. Podsiadly, A. Sikora, J. D. Lambeth, B. Kalyanaraman, *Mitigation of NADPH Oxidase 2 Activity as a Strategy to Inhibit Peroxynitrite Formation*, J. Biol. Chem. **291** (2016) 7029–44.

IF₂₀₁₆ = 4.125, my contribution = **10%**, number of citations: **28**

My contribution consisted of scientific consultations, discussion of the results and revision of the final manuscript.

B14. K. Debowska, D. Debski, M. Hardy, M. Jakubowska, B. Kalyanaraman, A. Marcinek, R. Michalski, B. Michalowski, O. Ouari, A. Sikora, R. Smulik, J. Zielonka, *Toward selective detection of reactive oxygen and nitrogen species with the use of fluorogenic probes – Limitations, progress, and perspectives*, Pharmacol. Rep. **67** (2015) 756–64. **IF₂₀₁₅ = 2.251**, my contribution = **20%**, number of citations: **24**

My contribution to this paper consisted of concept of this article, preparation of its part discussing the use of boronate probes for the detection of peroxynitrite and preparation of the final manuscript.

B15. B. Kalyanaraman, G. Cheng, M. Hardy, O. Ouari, A. Sikora, J. Zielonka, M. Dwinell, *Mitochondria-targeted metformins: anti-tumor and redox signalling mechanisms*, Interface Focus **7** (2017) 20160109. **IF₂₀₁₇ = 3.165**, my contribution = **10%**, number of citations: **4**

My contribution consisted of scientific consultations, discussion of the results and revision of the final manuscript.

B16. B. Kalyanaraman, G. Cheng, M. Hardy, O. Ouari, A. Sikora, J. Zielonka, M. B. Dwinell, *Modified metformin as a more potent anticancer drug: mitochondrial inhibition, redox signaling, antiproliferative effects and future EPR studies*, Cell Biochem. Biophys. **75** (2017) 311–17. **IF₂₀₁₇ = 1.455**, my contribution = **10%**, number of citations: **6**

My contribution consisted of scientific consultations, discussion of the results and revision of the final manuscript.

B17. J. Zielonka, M. Hardy, R. Michalski, A. Sikora, M. Zielonka, G. Cheng, O. Ouari, R. Podsiadly, B. Kalyanaraman, *Recent developments in the probes and assays for*

measurement of the activity of NADPH oxidases, Cell Biochem. Biophys. **75** (2017) 335–49.

IF₂₀₁₇ = 1.455, my contribution = **10%**, number of citations: **4**

My contribution consisted of scientific consultations and revision of the final manuscript.

B18. M. Hardy, J. Zielonka, H. Karoui, A. Sikora, R. Michalski, R. Podsiadły, M. Lopez,

J. Vasquez-Vivar, B. Kalyanaraman, O. Ouari. *Detection and characterization of reactive oxygen and nitrogen species in biological systems by monitoring species-specific products.*

Antioxid. Redox. Signal. **28** (2018) 1416–1432. **IF₂₀₁₇ = 6.530**, my contribution = **15%**, number of citations: **3**

My contribution to this paper consisted of preparation of its part discussing the use of boronate probes for selective detection of peroxynitrite and revision of the final manuscript.

6.2. Participation in the research projects

1. *From selective detection of cellular oxidants and small molecule signaling agents to a better understanding of their biological chemistry.* (2016–2021) grant from the *National Science Centre* under the SONATA BIS program (2015/18/E/ST4/00235); **primary investigator**.
2. *The synthesis and characterization of novel profluorescent probes for the detection of peroxynitrite* (2012–2014), grant from the *polish Ministry of Science and Higher Education* under the *luventus Plus* program (IP 2011 049271); **primary investigator**.
3. *Mechanistic aspects of the oxidative transformation of selected fluorogenic probes for reactive oxygen species.* (2010–2012), grant from the *Foundation for Polish Science* under the *Homing Plus* program (HOMING PLUS/2010-1/12); **primary investigator**.
4. *Endothelium in diseases of civilization: from basic research to innovative endothelium-targeted pharmacotherapeutic.* (2010–2015), grant from the *National Centre for Research and Development* (POIG 01.01.02-00-069/09); investigator.

5. *Direct identification of reactive metabolites as an important factor for assessing the safety of chemical substances.* (2007–2010), grant from the polish *Ministry of Science and Higher Education* (N205 003 32/0258); investigator.
6. *Therapeutic potential of nicotinamide derivatives - their action on vascular endothelium. Research task: Redox properties of nicotinamide derivatives and their reactivity towards reactive oxygen species* (2004–2007), grant from the polish *Ministry of Science and Higher Education* (KBN K103/T09/2004); investigator.

6.3. Participation in conferences and conference committees

A. *Conferences, workshops and seminars (I include only those conferences, which I personally attended and presented the results of research)*

1. *Biological chemistry of nitroxyl (HNO) – the most elusive reactive nitrogen species –* Renata Smulik-Izydorczyk, Angelika Gerbich, Jacek Zielonka, Jakub Pięta, Jan Adamus, Radosław Michalski, Balaraman Kalyanaraman, Adam Sikora – scientific seminar “Signaling Molecules and Biological Oxidants – Chemistry, Detection and Redox Biology”, Konopnica, Poland, 2018 – **lecture**
2. *A kinetic study on the reactivity of azanone (HNO) toward its selected scavengers –* Adam Sikora, Renata Smulik-Izydorczyk, Angelika Gerbich, Jan Adamus, Radosław Michalski – The 9th PULS Conference on Pulse Investigations in Chemistry, Physics, and Biology, Lodz, Poland, 2018 – poster
3. *Oxidation of the selected probes for detection of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) in aqueous solutions of nitric oxide donors –* Karolina Dębowska, Renata Smulik-Izydorczyk, Jakub Pięta, Jan Adamus, Radosław Michalski, Adam Sikora – The 19th biennial meeting for the Society for Free Radical Research International (SFRRRI), Lisbon, Portugal, 2018 – poster
4. *Kinetic and quantum-mechanical study on the decomposition of Piloty’s acid derivatives – toward the understanding of factors controlling HNO release –* Adam Sikora, Renata Smulik-Izydorczyk, Angelika Gerbich, Michał Rostkowski, Jan Adamus, Jakub Pięta, Karolina Dębowska, Radosław Michalski, Andrzej Marcinek, Dominika Jarmoc, Agnieszka

Leszczyńska, Karol Kramkowski – Gordon Research Conference “Oxygen Radicals”,
Ventura, CA, USA, 2018 – **lecture**

5. *Azaron (HNO) - chemistry, biological chemistry and detection of the mysterious reactive nitrogen species* – Adam Sikora – seminar at the Institute of Organic Chemistry, Lodz University of Technology, Lodz, Poland, 2017 – **invited lecture**
6. *N,N,N',N'-tetramethylhydroethidine (TMHE) – in search for novel probes for the detection of superoxide radical anion* – Adam Sikora, Radosław Michalski, Adrianna Mesjasz, Micael Hardy, Olivier Ouari, Jacek Zielonka, Balaraman Kalyanaraman – SFRBM's 24th Annual Meeting, Baltimore, Maryland, USA, 2017 – poster
7. *The chemistry and chemical biology of HNO – a kinetic study on the reactivity of HNO toward its selected scavengers* – Renata Smulik-Izydorczyk, Adrianna Mesjasz, Angelika Gerbich, Jan Adamus, Radosław Michalski, Adam Sikora – 25th Krakow Conference on Endothelium, 2017, Krakow, Poland, 2017 – poster
8. *Nitroxyl (HNO) – Chemistry, biology, and detection of the most elusive reactive nitrogen species* – Adam Sikora – Second Adriatic Symposium on Biophysical Approaches in Biomedical Studies, Split, Croatia, 2017 – **invited lecture**
9. *Nitroxyl (HNO) – chemistry, biology and detection* – Renata Smulik-Izydorczyk, Adrianna Mesjasz, Angelika Gerbich, Jacek Zielonka, Karolina Dębowska, Radosław Michalski, Jakub Pięta, Jan Adamus, Balaraman Kalyanaraman, Adam Sikora – EMBO Conference on Redox Biology, Moscow – Saint Petersburg, Russia, 2017 – poster
10. *The pulse radiolytic study of one-electron oxidation of hydroethidine, the probe for the detection of superoxide radical anion* – Adam Sikora, Bartosz Michałowski, Radosław Michalski, Micael Hardy, Olivier Ouari, Jan Adamus, Andrzej Marcinek, Jacek Zielonka, Balaraman Kalyanaraman – 5th International Conference on Radiation and Applications in Various Fields of Research, Budva, Montenegro, 2017 – poster
11. *N,N,N',N'-tetramethylhydroethidine (TMHE) – in search for better probes for the detection of superoxide radical anion* – Adam Sikora, Radosław Michalski, Adrianna Mesjasz, Micael Hardy, Olivier Ouari, Jan Adamus, Jacek Zielonka, Balaraman Kalyanaraman – OCC World Congress 2017 and Annual SFRR-E Conference, Berlin, Germany, 2017 – poster

12. *The chemistry and chemical biology of azanone (HNO) – a mysterious cousin of nitric oxide* – Adam Sikora, Renata Smulik-Izydorczyk, Adrianna Mesjasz, Angelika Gerbich, Radosław Michalski, Jan Adamus – International Workshop Bioinorganic Redox Control, Krakow, Poland, 2017 – **invited lecture**
13. *Mechanistic aspects of reactivity of selected probes for the detection of reactive oxygen and nitrogen species* – Adam Sikora – scientific seminar at the Institute of Nuclear Chemistry and Technology, Warsaw, Poland, 2016 – **invited lecture**
14. *The kinetic study on the reactivity of nitroxyl (HNO) towards nitrite ions, hydroxylamine, selected nitroso compounds and triphenylphosphines* – Adam Sikora, Renata Smulik-Izydorczyk, Adrianna Mesjasz, Jan Adamus – SfRBM's 23rd Annual Meeting, San Francisco, CA, USA, 2016 – poster
15. *What do we really know about boronate probes? (Molecular factors affecting reactivity)* – Adam Sikora – Xth International EPR Workshop on EPR in Biology and Medicine, Krakow, Poland, 2016 – **invited lecture**
16. *What do we really know about HNO reactivity? Implications for its fluorescent imaging in vivo* – Adam Sikora – 17th International Conference on Oxidative Stress Reduction, Redox Homeostasis and Antioxidants, Paris, France, 2016 – **lecture**
17. *Nitroxyl (HNO) - enigmatic cousin of nitric oxide* – Adam Sikora – 7th Interdisciplinary Seminar of Jagiellonian Centre for Experimental Therapeutics, Wierchomla Wielka, Poland, 2016 – **invited lecture**
18. *The use of boronate probes for the detection of reactive oxygen and nitrogen species* – Adam Sikora – 3rd International Conference and Exhibition on Biosensors and Bioelectronics. San Antonio, USA, 2014 – **lecture**
19. *The use of boronate probes in the studies on nitroxyl (HNO) reactivity* – Renata Smulik, Dawid Dębski, Bartosz Michałowski, Jan Adamus, Jacek Zielonka, Balaraman Kalyanaraman, Adam Sikora – Oxidative Stress Conference 2014. Oropesa, Spain, 2014 – **lecture**
20. *The fluorescein-based boronate probe FBISBBE and FBBE as a useful tools for the detection of peroxynitrite* – Karolina Gumińska, Dawid Dębski, Bartosz Michałowski, Jan Adamus, Tomasz Wójcik, Stefan Chłopicki, Adam Sikora – 12th ISANH International

Conference on Oxidative Stress, Redox States and Antioxidants. Clinical Advances – Challenges – Perspectives. Paris, France, 2013 – poster

21. *The effect of glutathione on the oxidation of hydroethidine in superoxide generating system: characteristic and the importance of HE radical cation* – Adam Sikora, Bartosz Michałowski, Dawid Dębski, Łukasz Piotrowski, Jan Adamus, Andrzej Marcinek – 6th European Young Investigator Conference. Slubice, Poland, 2013 – poster
22. *Reactivity of mitochondria-targeted arylboronic acid isomers toward peroxynitrite* – Adam Sikora, Jacek Zielonka, Jan Adamus, Dawid Dębski, Agnieszka Dybała-Defratyka, Joy Joseph, Richard C. Hartley, Michael P. Murphy, Balaraman Kalyanaraman – 3rd World Congress on Targeting Mitochondria. Strategies, Innovations and Clinical Applications. Berlin, Germany, 2012 – poster
23. *Reactivity of resorufin-based fluorogenic probe PC1 toward ROS/RNS and its use in the studies of peroxynitrite reactivity* – Adam Sikora, Łukasz Piotrowski, Dawid Dębski, Karolina Gumińska, Jan Adamus, Andrzej Marcinek, Jacek Zielonka, Balaraman Kalyanaraman – SFRBM's 19th Annual Meeting. San Diego, CA, USA, 2012 – poster
24. *Mechanistic aspects of the reaction of peroxynitrite with mitochondria-targeted arylboronic acid isomers* – Adam Sikora, Jacek Zielonka, Jan Adamus, Dawid Dębski, Bartosz Michałowski, Joy Joseph, Michael P. Murphy, Balaraman Kalyanaraman – IARC Workshop on Reactive Intermediates for Young Scholars and Graduate Students. Spala, Poland, 2012 – **lecture**
25. *The UPLC/MS study of the reaction of glutathione with boronate resorufin-based fluorogenic probe PC1* – Adam Sikora, Bartosz Michałowski, Dawid Dębski, Jan Adamus, Andrzej Marcinek – ISC'2012. 29th International Symposium on Chromatography. Torun, Poland, 2012 – poster
26. *Reactivity of resorufin-based fluorogenic boronate probe PC1 towards ROS/RNS and its use in the studies of peroxynitrite reactivity* – Adam Sikora, Jan Adamus, Łukasz Piotrowski, Dawid Dębski, Karolina Gumińska, Andrzej Marcinek, Piotr Kwiatkowski – 39th Annual Meeting of the European Radiation Research Society. Vietri sul Mare, Italy, 2012 – poster

27. *Different reaction profiles of mitochondria-targeted arylboronic acid isomers with peroxynitrite* – Adam Sikora, Jacek Zielonka, Jan Adamus, Dawid Debski, Joy Joseph, Michael P. Murphy, Balaraman Kalyanaraman – SFRBM's 18th Annual Meeting, Atlanta, GA, USA, 2011
28. *Characterization of one-electron oxidation products of Amplex Red, a fluorescent probe for detection of reactive oxygen species* – Adam Sikora, Dawid Dębski, Jan Adamus – 54th Annual Meeting of Polish Chemical Society. Lublin, Poland, 2011 – poster
29. *The pulse of radiolysis study of the transient products of one-electron oxidation of fluorescent probe Amplex Red* – Adam Sikora, Dawid Dębski, Jan Adamus, Jacek Zielonka, Balaraman Kalyanaraman – EYIC. 5th European Young Investigator Conference. Slubice, Poland, 2011 – poster
30. *Novel tools in the research on antioxidants – the global profiling of ROS/RNS in cell-free and cellular systems* – Adam Sikora, Jacek Zielonka, Monika Zielonka, Joy Joseph, Jan Adamus, Agnieszka Dybała-Defratyka, Łukasz Piotrowski, Michael Hardy, Olivier Ouari, Balaraman Kalyanaraman – ICRR 2011. 14th International Congress of Radiation Research. Incorporating 57th Annual Meeting of the Radiation Research Society. Warsaw, Poland, 2011 –**invited lecture**
31. *Redox properties of aryl boronate compounds* – Adam Sikora, Łukasz Piotrowski, Agnieszka Dybała-Defratyka, Jan Adamus, Andrzej Marcinek, Jacek Zielonka, Balaraman Kalyanaraman. SFRR-Europe 2011 Meeting. "Redox Biology and Micronutrients: From Signaling to Translation and Back." Istanbul, Turkey, 2011
32. *The mechanism of the oxidative transformation of boronate compounds – a quantum mechanical study* – Adam Sikora, Agnieszka Dybała-Defratyka, Jacek Zielonka, Andrzej Marcinek, Balaraman Kalyanaraman – SFRBM's 17th Annual Meeting. SFRRI's 15th Biennial Meeting. Orlando, Florida, USA, 2010 – poster
33. *The mechanistic aspects of the reaction of peroxynitrite with boronate compounds* – Adam Sikora, Jacek Zielonka, Marcos Lopez, Joy Joseph, Andrzej Marcinek, Balaraman Kalyanaraman – VIIIth International Workshop on EPR (ESR) in Biology and Medicine. Krakow, Poland, 2010 – **lecture**

34. *Oxidation of coumarin boronate to hydroxycoumarin by different fluxes of nitric oxide and superoxide: quantitative measurements of peroxynitrite under various nitric oxide/superoxide fluxes* – Adam Sikora, Jacek Zielonka, Joy Joseph, Balaraman Kalyanaraman – 16th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine. San Francisco, CA, USA, 2009 – poster
35. *Apocynin inhibits carbonate radical-induced aggregation of human Cu,Zn-SOD* – Adam Sikora, Jacek Zielonka, Łukasz Piotrowski, Christopher Andrekopoulos, Joy Joseph, Jan Adamus, Andrzej Marcinek, X. Allen Li, Balaraman Kalyanaraman – SFRBM's 15th Annual Meeting, Indianapolis, IN, USA, 2008
36. *Characterization of clozapine and olanzapine radical cations, radicals and nitrenium cations* – Adam Sikora, Andrzej Marcinek - EYIC'07. 3rd European Young Investigator Conference. Slubice, Poland, 2007 – poster
37. *Spectroscopic characterization of diphenylnitrosamine transient oxidation products* – Adam Sikora, Jan Adamus, Andrzej Marcinek – VII International Workshop on EPR(ESR) in Biology and Medicine. Krakow, Poland, 2007 – poster
38. *Characterization of dihalide and pseudohalide anion radicals generated by radiation in methylene chloride*. Adam Sikora, Radosław Michalski, Jan Adamus, Andrzej Marcinek. 14th Annual Meeting of Polish Radiation Research Society. Kielce, Poland, 2007 – poster
39. *Novel matrices for characterization of radical ions* – Adam Sikora, Jan Adamus, Andrzej Marcinek – 49th Annual Meeting of Polish Chemical Society. Gdansk, Poland, 2006

B. Participation in conference organization

1. Scientific seminar "Signalling Molecules and Biological Oxidants – Chemistry, Detection and Redox Biology". Konopnica, Poland, 2018 – *organizer*
2. First Adriatic Symposium on Biophysical Approaches in Biomedical Studies, Split, Croatia, 2014 – *member of the scientific advisory board and session chair*
3. "Oxygen Radicals" Gordon-Merck Research Seminar: (Patho)physiology of Redox Processes, Ventura, CA, USA, 2014 – *discussion leader*
4. 6th European Young Investigator Conference, Slubice, Poland, 2013 – *organizer*

5. IARC Workshop on Reactive Intermediates for Young Scholars and Graduate Students.
Spala, Poland, 2012 – *organizer*

6.4. Membership in scientific organizations and associations

- Society for Free Radical Biology and Medicine/Society for Redox Biology and Medicine – 2008–present – *member*
- Society for Free Radical Research – Europe – 2011–present – *member*

6.5. Short- and long-term scientific visits

1. 2008–2009 – *postdoctoral fellow* – Department of Biophysics and Free Radical Research Center, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, WI, USA – research on the mechanism and kinetics of oxidation of boronate compounds by hydrogen peroxide, hypochlorite and peroxynitrite.
2. 10–11.2009 – *visiting scientist* – Department of Biophysics and Free Radical Research Center, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, WI, USA – research on the use of coumarin boronic acid as a fluorogenic probe for the detection of peroxynitrite.
3. 08–09.2010 – *visiting scientist* – Department of Biophysics and Free Radical Research Center, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, WI, USA – research on the mechanism of the free radical pathway of the reaction of peroxynitrite with boronate compounds – EPR study with the use of spin-trapping technique.
4. 07–08.2011 – *visiting scientist* – Department of Biophysics and Free Radical Research Center, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, WI, USA – research on the mechanism and kinetics of the reaction of peroxynitrite with mitochondria-targeted phenylboronic acids.
5. 07.2018 – *visiting scientist* – Department of Biophysics and Free Radical Research Centre, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, WI, USA – research on the novel boronate probes designed for the detection of peroxynitrite and hydrogen peroxide inside mitochondria of living cells and the study on the peroxynitrite production from eNOS.

6.6. International and national collaboration

During the last 9 years, that have passed since the end of my postdoctoral stay at the research group of prof. Balaraman Kalyanaraman at the Medical College of Wisconsin in Milwaukee, I maintained close scientific cooperation with this research team, that is reflected in the co-authorship of many scientific papers (see above). In addition to this close cooperation, I have also collaborated with following scientists from Europe and Poland:

- Dr. Micael Hardy (Aix Marseille Universite, Institut de Chimie Radicalaire, Marseille, France) – cooperation on the development and characterization of new fluorogenic probes for the detection of superoxide radical anion (mainly hydroetidine derivatives);
- Prof. Stefan Chłopicki (Jagiellonian Centre for Experimental Therapeutics (JCET), Jagiellonian University, Krakow, Poland) – cooperation on the development of biologically active pyridinium salts, being nitric oxide donors, and on the development of the methodology for detection of reactive oxygen and nitrogen species with the use of molecular probes;
- Dr. Karol Kramkowski (Medical University of Białystok, Department of Physical Chemistry, Białystok, Poland) – the cooperation on the characterization of new HNO donors from the group of Piloty acid derivatives.

During the last 9 years, I also cooperated with other research teams in Poland and abroad, providing for their needs various compounds not available commercially, mainly fluorogenic probes, but also biologically active mitochondria-targeted compounds.

6.7. Reviewing scientific manuscripts

- *Biosensors and Bioelectronics* – 3 reviews
- *Chemical Communications* – 1 review
- *Free Radical Biology and Medicine* – 4 reviews
- *Free Radical Research* – 1 review
- *Journal of Analytical Methods in Chemistry* – 1 review

- *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* – 4 reviews
- *Talanta* – 2 reviews
- *Dyes and Pigments* – 1 review

6.8. Participation in expert and scientific competition jury panels

- Reviewer of abstracts submitted for the 24th Annual Meeting of the Society for Redox Biology and Medicine (SfRBM), Baltimore, Maryland, 2017
- Reviewer of abstracts submitted for the 25th Annual Meeting of the Society for Redox Biology and Medicine (SfRBM), Chicago, Illinois, 2018

6.9. Major awards related to the scientific activity

- 2009 – award of the Rector of the Lodz University of Technology for scientific achievements
- 2011 – award of the Rector of the Lodz University of Technology for scientific achievements
- 2015 – award of the Rector of the Lodz University of Technology for scientific achievements
- 2015 – *Recognized reviewer* – award from the Editors of the *Free Radical Biology & Medicine* journal
- 2017 – award of the Rector of the Lodz University of Technology for scientific achievements
- 2017 – *Outstanding reviewer* – award from the Editors of the *Free Radical Biology & Medicine* journal
- 2017 – *Recognized reviewer* – award from the Editors of the *Biosensors and Bioelectronics* journal
- 2018 – award of the Rector of the Lodz University of Technology for scientific achievements
- 2018 – *Recognized reviewer* – award from the Editors of the *Talanta* journal
- 2018 – *Outstanding reviewer* – award from the Editors of the *Talanta* journal
- 2018 – *Recognized reviewer* – award from the Editors of the *Dyes and Pigments* journal

7. Educational activity

7.1. Academic courses

During the last 10 years I taught the following classes:

- *Physical Chemistry* – laboratory,
- *Isotopic Methods in Building Materials Analysis* – laboratory,
- *Free Radicals in Chemistry, Biology and Medicine* – lectures and laboratory,
- *Basics of Biopharmaceutics and Pharmacokinetics* – lectures and laboratory,
- *Thermodynamics* – lectures, tutorials and laboratory.

7.2. Preparation of teaching programs for academic courses

1. Preparation of teaching program for academic course *Free Radicals in Chemistry, Biology and Medicine*.
2. Preparation of teaching program for academic course *Basics of Biopharmaceutics and Pharmacokinetics*.
3. Preparation of teaching program for academic course *Oxidative Modifications of Biomolecules and Biopolymers*.

7.3. Supervision of BSc students

1. Adrianna Mesjasz, *An experimental investigation on the reactivity of HNO (azanone) towards nitrite ion (III), hydroxylamine, selected nitroso compounds and selected phosphines*, Lodz, 2016 (BSc thesis supervisor).
2. Angelika Gerbich, *Characterization of selected azanone donors*, Lodz, 2016 (BSc thesis supervisor).
3. Kinga Zawiaślak, *Characterization of pyrene-1-boronic acid as a profluorescent probe for the detection of reactive oxygen and nitrogen species*, Lodz, 2016 (BSc thesis supervisor).

4. Kacper Bajorski, *Oxidation of the selected probes for detection of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) in aqueous solutions of nitric oxide donors*, Lodz, 2018 (BSc thesis supervisor).
5. Paweł Zerbe, *Reactivity of diphenyl-1-pyrenylphosphine probe towards selected ROS and RNS*, Lodz, 2018 (BSc thesis supervisor).

7.4. Supervision of MSc students

1. Dawid Dębski, *Characterization of the transient species formed upon one-electron oxidation of 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine*, Lodz, 2011 (MSc thesis supervisor).
2. Katarzyna Bandzierz, *Characterization of the transient species formed upon one-electron oxidation of selected boronate compounds*, Lodz, 2011 (MSc thesis supervisor).
3. Karolina Grzelak, *Characterization of the reactivity of boronate derivative of resorufin (PC1) towards selected reactive oxygen species*, Lodz, 2012 (MSc thesis supervisor).
4. Karolina Gumińska, *Reactivity of resorufin-based boronate probe PC1 towards peroxynitrite and its use in the studies on the peroxynitrite and hypochlorous acid reactivity*, Lodz, 2012 (MSc thesis supervisor).
5. Karolina Pierzchała, *The reactivity of hydroethidine towards selected peroxy radicals*, Lodz, 2013 (MSc thesis supervisor).
6. Renata Smulik, *Application of boronate probes in HNO reactivity survey*, Lodz, 2013 (MSc thesis supervisor).
7. Magdalena Maj, *Characterization of boronate coumarin derivatives as profluorescent probes for peroxynitrite detection*, Lodz, 2013 (MSc thesis supervisor).
8. Angelika Gerbich, *Characterization of the 4-((9-acridinecarbonyl)amino)-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl (TEMPO-9-Ac) as a profluorescent probe for the detection of azanone (HNO)*, Lodz, 2013 (MSc thesis supervisor).

7.5. Supervision of PhD students

1. Dawid Dębski, *Mechanistic aspects of oxidative conversion of molecular probes for the detection of hydrogen peroxide and peroxyxynitrite*, Lodz, 2016 (scientific advisor).
2. Bartosz Michałowski, *Mechanistic aspects of detection of reactive oxygen and nitrogen species with the use of selected fluorogenic probes*, Lodz, 2017 (scientific advisor).
3. Karolina Dębowska, *Characterization of the catalytic antioxidants and probes for the detection of peroxyxynitrite* (the manuscript of PhD thesis in preparation), (scientific advisor).
4. Renata Smulik-Izydorczyk, *Characterization of the reactivity of azanone (HNO) and its selected donors* (the defense of the PhD thesis is scheduled for February 5, 2019), (scientific advisor).

8. Academic administrative appointments

10.2016–present Deputy Director of the Institute of Applied Radiation Chemistry, Faculty of Chemistry, Lodz University of Technology

10.2016–present member of the Council of the Faculty of Chemistry, Lodz University of Technology

15.02.2019r.

