

Seminarium naukowe
„Na pograniczu biologii redoks
i chemii reaktywnych indywiduów
chemicznych”

27-28 czerwca 2025

Łódź, Polska



Plan Seminarium

Piątek, 27.06			
12.30-13.00	Rejestracja		
13.00-13.05	Otwarcie i powitanie		
13.05-13.35	How the structure of model disulfides affects reactivity Tomasz Pędziński, <i>Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu</i>	str. 3	
13.35-14.05	Fotosensybilizowane utlenianie białek w warunkach beztlenowych Marta Ignasiak-Kciuk, <i>Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu</i>	str. 4	
14.05-14.35	Udział 2,4-Heptadienu w fotoreaktywności utlenionego kwasu dokozaheksaenowego i lipidów siatkówkowych Anna Pawlak, <i>Uniwersytet Jagielloński</i>	str. 5	
14.35-15.05	Modulacja aktywności fotoprotekcyjnej eumelaniny przez stan redoks: mechanizm dezaktywacji tlenu singletowego 1O_2 Joanna Waresiak, <i>Uniwersytet Jagielloński</i>	str. 6	
15.05-15.35	Zdjęcie pamiątkowe Przerwa kawowa		
15.30-16.15	Sesja posterowa (Streszczenia str. 19 – 28)		
16.15-16.45	Metallofullerenol $Gd@C_{82}(OH)_{22}$ chroni integralność błony komórkowej erytrocytów ludzkich przed stresem oksydacyjnym indukowanym przez AAPH: Mechanizmy molekularne i aktywność antyoksydacyjna Jacek Grębowski, <i>Uniwersytet Łódzki; Wojskowy Instytut Medyczny – Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie</i>	str. 7	
16.45-17.15	Nowa metoda identyfikacji inhibitorów oksydazy ksantynowej – w poszukiwaniu leków na dnę moczanową Monika Rola, <i>Politechnika Łódzka</i>	str. 9	
17.15-17.35	Uszkodzenia oksydacyjne erytrocytów człowieka przez bromowane środki uniepalniające (BFRs) Anita Krokosz, <i>Uniwersytet Łódzki</i>	str. 10	
20.00	Spotkanie towarzyskie w klubie „Piwoteka” (dla chętnych)		

Sobota, 28.06		
10.00-10.30	Jak poskromić wolne rodniki – rozwój nowych metod selektywnej detekcji nadtlenoazotynu <i>Jacek Zielonka Medical College of Wisconsin, Milwaukee, USA</i>	str. 11
10.30-11.00	Detekcja nadtlenosiarczanu z wykorzystaniem próbników <i>Radosław Podsiadły, Politechnika Łódzka</i>	str. 12
11.00-11.30	Czego możemy się dowiedzieć z pomiarów tlenu singletowego w żywych komórkach ? <i>Grzegorz Szewczyk, Uniwersytet Jagielloński</i>	str. 13
11.30-12.00	Utlenianie próbników opartych o hydroetydynę przez rodniki o znaczeniu biologicznym – wykrywanie anionorodnika ponadtlenkowego <i>Radosław Michalski, Politechnika Łódzka</i>	str. 14
12.00-12.30	Przerwa kawowa	
12.30-13.00	Metodologia przyżyciowych wizualizacji fluorescencyjnych na przykładzie wykazania przeciwzakrzepowego działania wybranych donorów HNO w mysim modelu eksperymentalnym <i>Karol Kramkowski, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku</i>	str. 15
13.00-13.30	Nowe strategie zastępowania konwencjonalnego azotanu (III) sodu w produktach mięsnych przy użyciu różnych donorów tlenu azotu <i>Marzena Zając, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie</i>	str. 17
13.30-14.00	Detekcja nadtlenoazotynu powstającego w reakcji dinitrozylowych kompleksów żelaza (DNIC) z anionorodnikiem ponadtlenkowym <i>Adam Sikora, Politechnika Łódzka</i>	str. 18
14.00-14.05	Zamknięcie seminarium	

Link do strony seminarium:

<https://mitr.p.lodz.pl/aktualnosci/seminarium-naukowe>

How the structure of model disulfides affects their reactivity

T. Pędziński¹, K. Grzyb¹, M. Borkowska²

¹ Wydział Chemii, Uniwersytet Adama Mickiewicza, Poznań, Polska

Disulfide bonds are critical structural elements in some biologically relevant peptides and proteins as they stabilize folded structures. Oxidative modifications of these linkages may be associated with a loss of structure and function. In this work we investigated the oxidation of a series of model disulfides with singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), a key intermediate in photo-oxidation reactions. The kinetics of disulfide-mediated $^1\text{O}_2$ removal were monitored using the time-resolved 1270 nm phosphorescence of $^1\text{O}_2$. The experiments were carried out using a home-made, time-resolved emission spectrophotometer based on TCSPC/MCS method. Stern-Volmer plots of these data showed a large variation in the quenching rate constants k_q (from 2×10^7 for α -lipoic acid to $3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ for cystamine). It was found that ring disulfides (lipoic acid, lipoamide) react more rapid than linear disulfides. LC-MS analyses show formation of mono- (thiosulfinate) and di-oxygenated (thiosulfonate) products. The variation in quenching rates and product formation are ascribed to zwitterion stabilization by neighboring, or remote, lone pairs of electrons. These data suggest that some disulfides, including some present within or attached to proteins (e.g., α -lipoic acid), may be selectively modified, and undergo subsequent cleavage, with adverse effects on protein structure and function.

Fotosensybilizowane utlenianie białek w warunkach beztlenowych

M. Ignasiak-Kciuk,¹ K. Frąckowiak¹, T. Pędziński¹, E. Fuentes-Lemus², Per Huggland²,
M. J. Davies², B. Marciniak^{1,3}

¹ Wydział Chemii, Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Poznań, Polska

² Wydział Biomedyczny, Uniwersytet Kopenhaski, Poznań, Polska

³ Centrum Zaawansowanych Technologii, Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Poznań, Polska

Aromatyczne reszty aminokwasowe (tyrozyna, fenyloalanina, tryptofan czy histydyna), a także reszty zawierające atom siarki (metionina i cysteina) wykazują podatność na reakcję z wieloma utleniaczami, w tym z niektórymi stanami wzbudzonymi sensybilizatorów. Jednym z nich jest 3-karboxybenzofenon, który po wzbudzeniu do stanu trypletowego może być wygaszony przez te aminokwasy na drodze przeniesienia elektronu lub, w niektórych przypadkach, przeniesienia energii. Wiele badań procesów sensybilizowanego utleniania białek prowadzonych jest w warunkach tlenowych, skupiając się głównie na tworzeniu tlenu singletowego i reaktywnych form tlenu. Jednak ze względu na ograniczone stężenia tlenu w niektórych warunkach fizjologicznych, procesy beztlenowe mogą odgrywać równie ważną rolę jak procesy z tlenem singletowym.

Aby w pełni móc scharakteryzować mechanizm oddziaływania między sensybilizatorem a aromatycznymi resztami aminokwasów, niezbędne były badania procesów pierwotnych (zarówno białek jak i układów modelowych), a także pełna charakterystyka produktów trwałych (łącznie techniki chromatograficzne, masowe i biochemiczne). Wykazano, że wygaszanie ³(3CB)* zachodzi przez przeniesienie elektronu dla reszt tryptofanowych, elektronu i protonu dla reszt tyrozynowych oraz przeniesienie energii jak i elektronu dla reszt histydynowych dla badanych układów modelowych i białkowych (białek pochodzenia roślinnego VrPhBP, MtN13, MtHPT1 oraz lizozymu).

Tworzone trwałe modyfikacje podzielono na trzy grupy: i) produkty będące kowalencyjnym adduktem tworzonym między rodnikiem 3CBH* a rodnikiem aminokwasowym, ii) dimery reszt aminokwasowych, iii) pozostałe produkty, takie jak Imid-CH₂-3CBH. W przypadku białek z grupy PR-10 (VrPhBP i MtN13) wykazano także tworzenie się kompleksu z sensybilizatorem w stanie podstawowym, mającego wpływ na procesy utleniania. Przebadano także wpływ utworzonych modyfikacji na funkcjonowanie badanych białek.

Udział 2,4-heptadienu w fotoreaktywności utlenionego kwasu dokozaheksaenowego i lipidów siatkówkowych

Pawlak A¹, Waresiak J¹, Breitenbach T², Bregnhøj M², Ogilby PR², Różanowska M³, Sarna T¹

¹Zakład Biofizyki, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków, Polska,

²Zakład Chemii Fizycznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Aarhus, Aarhus, Dania

³Wydział Optometrii i Nauk o Widzeniu, Uniwersytet Cardiff, Cardiff, UK

Lipidy wchodzące w skład siatkówki stanowią 20-30% jej suchej masy. Niemal 75% tych lipidów to fosfolipidy, z których jedna trzecia zawiera reszty wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA), m.in. kwas dokozaheksaenowy (22:6n-3, DHA) [1]. Wysoki poziom PUFA w komórkach siatkówki jest niezbędny dla utrzymania wysokiej płynności błon fotoreceptorów, jednak obecność wiązań nienasyconych sprawia, że PUFA są bardzo wrażliwe na utlenienie [2]. Wysoce reaktywne produkty utleniania PUFA mogą nieodwracalnie modyfikować kluczowe składniki komórek i ostatecznie prowadzić do wystąpienia procesów degeneracyjnych [3]. Dotychczas wykazano, że lipidy wyekstrahowane z siatkówki ludzkiej i bydłej są fotoreaktywne i podobnie jak sam utleniony DHA w wyniku naświetlania krótkofalowym światłem widzialnym mogą generować reaktywne formy tlenu [4, 5]. 2,4-heptadien należy do późnych produktów utlenienia w-3 wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, który absorbuje światło widzialne o krótkiej długości fali. Celem niniejszej pracy było zbadanie fotoreaktywności oraz fototoksyczności 2,4-heptadienu oraz jego udział w obserwowanej wypadkowej fotoreaktywności utlenionego kwasu dokozaheksaenowego. Badania aktywności fotochemicznej 2,4-heptadienu przeprowadzono za pomocą oksymetrii i pułapkowania spinowego EPR. Wydajność kwantową generowania tlenu singletowego przez 2,4-heptadien określono za pomocą czasowo-rozdzielczej detekcji fosforescencji przy 1270 nm. Możliwe powstawanie i obecność 2,4-heptadienu w ekstraktach lipidowych siatkówki monitorowano za pomocą spektroskopii HPLC i Ramana. Otrzymane wyniki wskazują, że po naświetlaniu światłem niebieskim 2,4-heptadien generuje tlen singletowy z wydajnością kwantową około 0,1, nieznacznie wyższą niż w przypadku ekstraktu lipidowego siatkówki ludzkiej, oraz anionorodnik ponadtlenkowy. 2,4-heptadien jest zdolny także do nieodwracalnej modyfikacji białek, a w komórkach nabłonka upigmentowanego siatkówki naświetlanych w jego obecności wykazuje umiarkowaną fototoksyczność. Chociaż uzyskane wyniki wskazują na niewielką fotoreaktywność 2,4-heptadienu, sugerują również, że ten związek może przyczyniać się do obserwowanej fotoreaktywności utlenionych lipidów siatkówki.

[1] N. Acar, O. Berdeaux, S. Gregoire, S. Cabaret, L. Martine, P. Gain, G. Thuret, C. P. Creuzot, Garcher, A. M. Bron, L. Bretillon, *PLoS One* 2012, 7, e35102.

[2] Tanito, M., R.S. Brush, M.H. Elliott, L.D. Wicker, K.R. Henry, and R.E. Anderson, *High levels of retinal membrane docosahexaenoic acid increase susceptibility to stress-induced degeneration*. *J Lipid Res*, 2009. 50(5): p. 807-19

[3] J. G. Hollyfield, V. L. Perez, R. G. Salomon, *Mol Neurobiol* 2010, 41, 290-298; bE. Kaemmerer, F. Schutt, T. U. Krohne, F. G. Holz, J. Kopitz, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007, 48, 1342-1347.

[4] A. Koscielniak, M. Serafin, M. Duda, T. Oles, A. Zadło, A. Broniec, O. Berdeaux, S. Gregoire, L. Bretillon, T. Sarna, A. Pawlak, *Cell Biochem Biophys* 2017, 75, 443-454

[5] Rozanowska M., Pawlak A., Rozanowski B., *Int J Mol Sci*, 2021, 22(7): 3525

Modulacja aktywności fotoprotekcyjnej eumelaniny przez stan redoks: mechanizm dezaktywacji tlenu singletowego $^1\text{O}_2$

J. Waresiak,^{1,3} F. Sagan², M. Mitoraj², T. Sarna¹

¹ Zakład Biofizyki, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków, Polska

² Katedra Metod Komputerowych Chemii, Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków, Polska

³ Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych, Uniwersytet Jagielloński, Kraków, Polska

Siatkówka ludzka jest szczególnie narażona na stres oksydacyjny ze względu na ekspozycję na światło o energii około 3 eV oraz wysokie ciśnienie parcjalne tlenu. W fotoprotekcji siatkówki biorą udział m.in. karotenoidy, takie jak luteina i zeaksantyna, a także melanina. W postmitotycznych komórkach nabłonka barwnikowego siatkówki (RPE), melanina syntetyzowana jest w okresie rozwoju płodowego, a następnie ulega stopniowej degradacji wraz z wiekiem. Uważa się, że związane z wiekiem modyfikacje oksydacyjne melaniny RPE są efektem procesów fotochemicznych. Co istotne, utleniona melanina wykazuje zwiększoną aktywność fotochemiczną, w tym wyższą wydajność generowania tlenu singletowego. Sugeruje to, że podjednostki melaniny w różnych stanach utlenienia różnią się poziomami energetycznymi pierwszych stanów wzbudzonych – zwłaszcza pierwszego stanu singletowego (S_1) i trypletowego (T_1).

W niniejszym badaniu określono energie pierwszych stanów wzbudzonych dla modeli eumelaniny w różnych stanach utlenienia: formy zredukowanej (hydrochinon, H_2Q), częściowo utlenionej (chinon, IQ) oraz całkowicie utlenionej (chinonoimina, QI). Przeanalizowano modele monomerów, struktur dimerowych oraz układów warstwowych. Przejścia adiabatyczne obliczono z wykorzystaniem funkcjonału CAM-B3LYP, przy zastosowaniu modelu rozpuszczalnika (woda) w ciągłym modelu solwatacyjnym oraz bazy def2-TZVP. Dla celów porównawczych wyznaczono również energie stanów wzbudzonych dla karotenoidów siatkówkowych (luteiny i zeaksantyny), przyjmując tetrahydrofuran jako rozpuszczalnik.

Wyniki potwierdziły, że podjednostki utlenionej melaniny charakteryzują się niższymi energiami pierwszych stanów wzbudzonych trypletowych w porównaniu do ich zredukowanych odpowiedników. Co więcej, wartości te były porównywalne, a niekiedy nawet niższe niż dla luteiny i zeaksantyny – karotenoidów znanych ze swojej wysokiej skuteczności w gaszeniu tlenu singletowego. Otrzymane wyniki sugerują, że utlenione formy eumelaniny mogą aktywnie uczestniczyć w mechanizmie gaszenia tlenu singletowego.

Metallofullerenol $Gd@C_{82}(OH)_{22}$ chroni integralność błony komórkowej erytrocytów ludzkich przed stresem oksydacyjnym indukowanym przez AAPH: Mechanizmy molekularne i aktywność antyoksydacyjna

A. Remigante¹, M. Studzian², S. Spinelli¹, P. Piotrowski³, G. Litwinienko³, K. Gorny⁴,
P. Raczynski⁴, A. Marino¹, R. Morabito¹, J. Grebowski^{5,*}

¹ Wydział Nauk Chemicznych, Biologicznych, Farmaceutycznych i Środowiskowych, Uniwersytet w Mesynie, Mesyna, Włochy.

² Katedra Biologii Nowotworów i Epigenetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Łódź, Polska; Laboratorium Regulacji Transkrypcyjnej, Instytut Biologii Medycznej PAN, Łódź, Polska.

³ Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa, Polska.

⁴ Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych, Uniwersytet Śląski, Chorzów, Polska.

⁵ Katedra Biologii Nowotworów i Epigenetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Łódź, Polska; Wojskowy Instytut Medyczny – Państwowy Instytut Badawczy, Warszawa, Polska. Adres e-mail: jacek.grebowski@biol.uni.lodz.pl.

Metallofullerenole i fullerenole przyciągają uwagę ze względu na swoją niezwykłą zdolność do oddziaływania z różnymi biologicznie istotnymi cząsteczkami, co otwiera drogę do zastosowań biomedycznych, od technik obrazowania medycznego po nośniki leków, działające z większą skutecznością i mniejszymi efektami ubocznymi. W niniejszej pracy zbadano wpływ dwóch pochodnych fulerenów — $Gd@C_{82}(OH)_{22}$ i $C_{70}(OH)_{12}$ — na składniki błony erytrocytów w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego przez dichlorowodorek 2,2'-azobis(2-amidynopropanu) (AAPH), będący źródłem rodników nadtlenkowych. Wyniki wykazały, że enkapsulacja gadolinu w klatce fulerenowej zwiększyła powinowactwo elektronowe $Gd@C_{82}(OH)_{22}$, co skutkowało silniejszą aktywnością antyoksydacyjną. $Gd@C_{82}(OH)_{22}$ tworzył ochronną, hydrofilową warstwę na granicy faz lipid-woda, skutecznie zapobiegając peroksydacji lipidów, uszkodzeniom oksydacyjnym białek oraz wyciekowi potasu, przewyższając pod tym względem $C_{70}(OH)_{12}$. Oba związki poprawiały płynność błony, jednak $Gd@C_{82}(OH)_{22}$ wykazywał lepsze zachowanie integralności dwuwarstwy lipidowej erytrocytów oraz funkcji białek. Ponadto $Gd@C_{82}(OH)_{22}$ utrzymywał funkcję wymiany anionowej białka pasma 3, kluczową dla homeostazy jonowej, poprzez zapobieganie agregacji wywołanej utlenianiem i ochronę grup tiolowych. Pomimo ograniczonej penetracji błony, $Gd@C_{82}(OH)_{22}$ stabilizował składniki błony poprzez tworzenie wiązań wodorowych, co pośrednio zwiększało sztywność i płynność błony pod wpływem stresu oksydacyjnego. Taka zewnętrzna ochrona integralności błony zmniejszała ryzyko peroksydacji lipidów i uszkodzeń oksydacyjnych białek erytrocytów. W przeciwieństwie do niego, $C_{70}(OH)_{12}$, choć skuteczny w ochronie lipidów błonowych, był mniej efektywny w zachowaniu struktury

białek. Otrzymane wyniki podkreślają unikalne właściwości ochronne $\text{Gd@C}_{82}(\text{OH})_{22}$, przypisywane efektom polaryzacyjnym indukowanym przez zamknięty wewnątrz atom Gd. Badanie to sugeruje, że metallofullerenole, takie jak $\text{Gd@C}_{82}(\text{OH})_{22}$, mogą mieć potencjał terapeutyczny w ograniczaniu uszkodzeń oksydacyjnych [1].

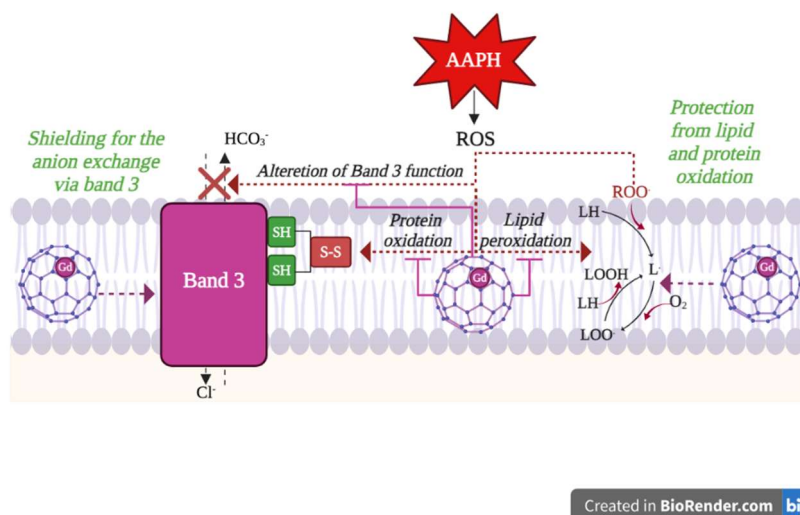


Figura 1. Schemat przedstawiający ochronny mechanizm działania metallofullerenolu $\text{Gd@C}_{82}(\text{OH})_{22}$ wobec błony komórkowej erytrocytów ludzkich poddanych stresowi oksydacyjnemu wywołanemu przez AAPH. $\text{Gd@C}_{82}(\text{OH})_{22}$ neutralizuje wolne rodniki, ogranicza peroksydację lipidów oraz stabilizuje strukturę błony, co przyczynia się do zachowania jej integralności i funkcji biologicznych.

Literatura

[1] Remigante A, Studzian M, Spinelli S, Piotrowski P, Litwinienko G, Gorny K, Raczyński P, Marino A, Morabito R, Grebowski J. Metallofullerenol $\text{Gd@C}_{82}(\text{OH})_{22}$ preserves human erythrocyte plasma membrane integrity from AAPH-induced oxidative stress: Molecular mechanisms and antioxidant activity. *Free Radic Biol Med.* 2025 1;229:499-513.

Finansowanie

Niniejsza praca została sfinansowana przez Narodowe Centrum Nauki (NCN), Polska (grant nr 2019/35/D/ST4/02627).

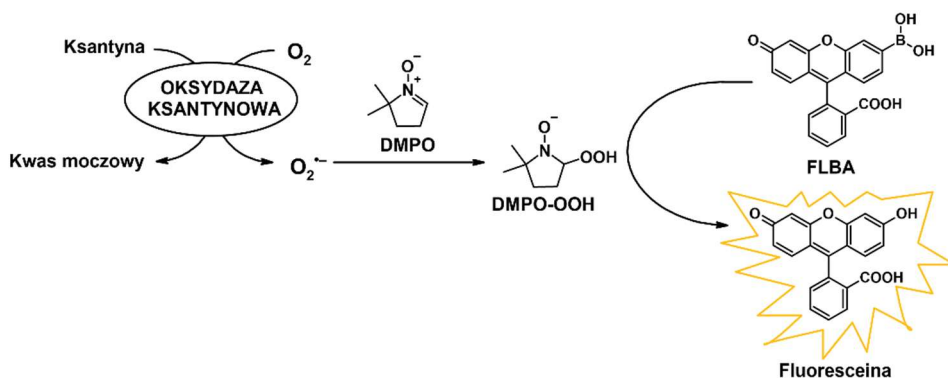
Nowa metoda identyfikacji inhibitorów oksydazy ksantynowej – w poszukiwaniu leków na dnę moczanową

M. Rola¹, J. Pięta¹, J. Zielonka²

¹Międzyresortowy Instytut Techniki Radiacyjnej, Wydział Chemiczny, Politechnika Łódzka, Łódź

²Department of Biophysics, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, USA

Oksydaza ksantynowa (XO), enzym z klasy oksydoreduktaz, odgrywa znaczącą rolę w katabolizmie puryn u ludzi. W wyniku fizjologicznej aktywności XO powstaje kwas moczowy i reaktywne formy tlenu (ROS), takie jak anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\bullet-}$) oraz nadtlenek wodoru (H_2O_2). Te ROS są wysoce reaktywne, co utrudnia ich bezpośredni pomiar ze względu na ich niskie stężenia w stanie stacjonarnym. Oksydaza ksantynowa jest ważnym celem współczesnej terapii, odgrywa bowiem kluczową rolę w rozwoju hiperurykემii, czyli zbyt wysokiego stężenia kwasu moczowego we krwi. Hiperurykemia jest głównym czynnikiem prowadzącym do dny moczanowej. Leki działające na zasadzie inhibicji XO dostępne na rynku europejskim i amerykańskim cechują się licznymi skutkami ubocznymi, co uzasadnia potrzebę poszukiwania nowych kandydatów na inhibitory o lepszym profilu bezpieczeństwa i skuteczności. Systematyczne przeszukiwanie dużych bibliotek związków z wykorzystaniem metod wysokoprzepustowych (HTS) może być obiecującym i skutecznym podejściem do identyfikacji takich związków.



Metoda BOOST (Boronate Oxidation Spin Trapping) umożliwia selektywne wykrywanie anionorodnika ponadtlenkowego, jednego z produktów działania oksydazy ksantynowej. W tej metodzie wykorzystuje się pułapki spinowe (np. DMPO) tworzące stabilne addukty z $O_2^{\bullet-}$ oraz próbники boronowe, które w reakcji z tymi adduktami generują produkty fluorescencyjne. Obecność inhibitora XO redukuje sygnał fluorescencyjny, umożliwiając szybką ocenę jego działania hamującego. Wstępne wyniki badań wskazują, że metoda BOOST może być wykorzystana w ramach protokołu HTS do identyfikacji związków wykazujących właściwości inhibujące względem XO które mogą stanowić punkt wyjścia do dalszych prac nad opracowaniem nowych substancji aktywnych.

Badania prezentowane w niniejszym wystąpieniu zostały sfinansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu PRELUDIUM 23 (nr projektu: 2024/53/N/ST4/02412)

Uszkodzenia oksydacyjne erytrocytów człowieka przez bromowane środki uniepalniające (BFRs)

Agata Pyrzanowska-Banasiak^{1,2}, Anita Krokosz^{1*}

¹ Katedra Biofizyki Skażeń Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Łódź, Polska

² Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych, Uniwersytet Łódzki, Łódź, Polska

* e-mail: anita.krokosz@biol.uni.lodz.pl

Bromowane środki zmniejszające palność (BFR) to syntetyczne związki, których zadaniem jest zmniejszenie palności materiałów polimerowych, powszechnie stosowane w przemyśle, a także do produkcji przedmiotów codziennego użytku. Powszechne stosowanie tych związków wiąże się z narażeniem człowieka na BFR (doi:10.13075/mp.5893.00491). Najczęściej stosowanym BRF jest tetrabromobisfenol A (TBBPA), którego roczna produkcja przekracza 220 000 ton (doi:10.1016/j.jes.2020.04.039). Tetrabromobisfenol S (TBBPS) został wprowadzony na rynek jako zamiennik TBBPA. Badania *in vitro* wykazały, że TBBPS, podobnie jak TBBPA, generuje reaktywne formy tlenu (ROS) co może prowadzić do utleniania komponentów komórkowych. Istnieje jeszcze niewiele danych na temat obecności TBBPS w środowisku i jego wpływu na organizmy żywe.

Celem pracy była ocena udziału procesów utleniania inicjowanych przez TBBPA i TBBPS w dojrzałych erytrocytach człowieka.

Uzyskane wyniki wskazują, że TBBPA od stężenia 15 µg/ml inicjuje stres oksydacyjny w erytrocytach, co obserwujemy poprzez spadek aktywności całkowitej błonowej ATPazy i wewnątrzkomórkowego poziomu GSH. Efektu tego nie zaobserwowano dla TBBPS do stężenia 100 µg/ml.

Poziom zredukowanego glutationu i aktywność ATPaz jonozależnych są kluczowe dla funkcjonowania komórek i są bezpośrednio związane z ochroną komórek przed stresem oksydacyjnym.

Wyniki te korelują z progowym wzrostem hemolizy indukowanej przez TBBPA przy stężeniu 15 mg/ml i potwierdzają, że TBBPS jest mniej toksycznym zamiennikiem TBBPA.

Jak poskromić wolne rodniki – rozwój nowych metod selektywnej detekcji nadtlenoazotynu

A. Grzelakowska,^{1,2} A. Sikora,³ R. Podsiadły,² M. Hardy,⁴ J. Zielonka¹

¹ Department of Biophysics, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, USA

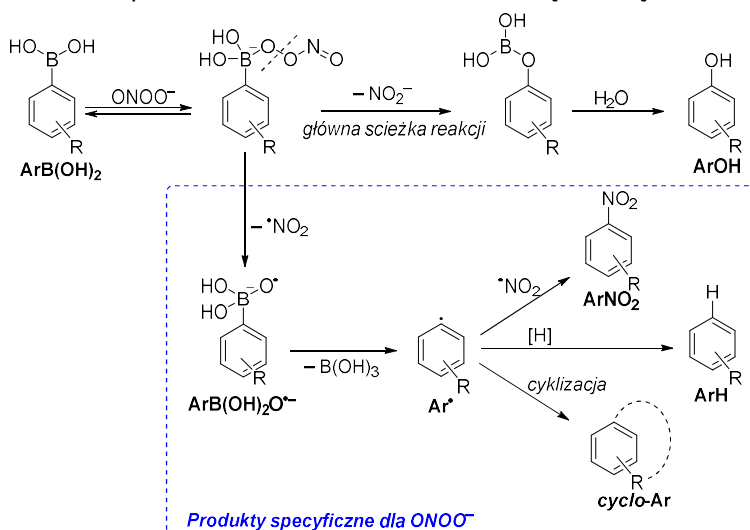
² Instytut Technologii Polimerów i Barwników, Politechnika Łódzka, Łódź, Polska

³ Międzyresortowy Instytut Techniki Radiacyjnej, Politechnika Łódzka, Łódź, Polska

⁴ Institut Chimie Radicalaire, Aix Marseille Université, Marsylia, Francja

Reakcja tlenu azotu z anionorodnikiem ponadtlenkowym jest jedną z najszybszych reakcji chemicznych zachodzących w układach biologicznych ($k = 1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) i prowadzi do powstania nadtlenoazotynu (ONOO^-), nietrwałego produktu o silnych właściwościach utleniających i nitrujących. Zwiększona produkcja nadtlenoazotynu towarzyszy ostrym i przewlekłym stanom zapalnym i przyjmuje się, że może on brać udział w patogenezie wielu chorób, w tym układu sercowo-naczyniowego, neurodegeneracyjnych i nowotworowych. Precyzyjne określenie roli ONOO^- w tych chorobach wymaga możliwości jego specyficznej detekcji i ilościowej analizy w układach biologicznych, co pozostaje wyzwaniem w dziedzinie chemii biologicznej.

Próbniki boronowe stanowią najbardziej obiecującą klasę związków do ilościowej i specyficznej detekcji ONOO^- . Wysoka wartość stałej szybkości reakcji związków boronowych z ONOO^- , wraz z powstawaniem specyficznych produktów na ścieżce rodnikowej, pozwala na potwierdzenie obecności i ilościową analizę ONOO^- .



W prezentacji zostaną przedstawione chemiczne podstawy analizy ONOO^- przy użyciu próbników boronowych, techniki analizy produktów utleniania w układach biologicznych, oraz rozwój nowej generacji próbników do detekcji fluorescencyjnej produktów specyficznych dla nadtlenoazotynu.

Detekcja nadtlenosiarczanu z wykorzystaniem próbników

R. Podsiadły¹

¹ *Instytut Technologii Polimerów i Barwników, Politechnika Łódzka, Łódź, Polska*

Siarczyny są szeroko stosowane jako przeciwutleniacze i konserwanty w napojach i żywności. Jednak stosunkowo często objawia się ich toksyczność, która wiąże się z reakcjami alergicznymi, astmą i wstrząsem anafilaktycznym. Mechanizm toksyczności siarczynów nie jest całkowicie poznany. Postuluje się, że przyczyną jest powstawanie rodników i tzw. stres oksydacyjny. Nadtlenosiarczan (HOOSO_3^-) powstaje podczas utleniania siarczynów. Jednak z powodu braku precyzyjnej metody wykrywania ich rola w mechanizmie toksyczności siarczynów jest całkowicie nieodkryta. W prezentowanym komunikacie przedstawione zostaną opracowane metody wykrywania nadtlenosiarczanu w oparciu o reakcję utleniania pro-fluorescencyjnych chemosensorów.

Czego możemy się dowiedzieć z pomiarów tlenu singletowego w żywych komórkach ?

Grzegorz Szewczyk¹, Krystian Mokrzyński¹

¹ Zakład Biofizyki, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków, Polska

Tlen singletowy ($^1\text{O}_2$) uznawany jest za najważniejszą reaktywną formę tlenu w terapii fotodynamicznej (PDT), będącej dynamicznie rozwijającą się metodą walki z nowotworami. Jego bezpośrednie pomiary opierają się na detekcji charakterystycznej fosforescencji przy długości fali 1272 nm. Tlen singletowy może być generowany wewnątrz komórek po uprzednim podaniu fotouczulaczy i ich wzbudzeniu światłem o odpowiedniej długości fali. Większość $^1\text{O}_2$ reaguje szybko z komponentami komórkowymi, co ogranicza jego czas życia do około 500 ns. Część cząsteczek może jednak dyfundować poza komórkę, umożliwiając ich detekcję w skali mikrosekundowej. Lokalizacja fotouczulaczy w komórce, zależna od wielu czynników, wpływa na efektywność zabijania komórek nowotworowych. Czasowo-rozdzielcze pomiary kinetyki generowania i zaniku tlenu singletowego dostarczają informacji na temat lokalizacji fotouczulacza i pozwalają częściowo przewidzieć jego skuteczność terapeutyczną w PDT. Przeprowadziliśmy badania na fotouczulaczach o różnej lokalizacji komórkowej (Rose Bengal, Methylene blue oraz protoporfiryna IX produkowana w komórkach po podaniu 5-ALA jako perkursora). Obserwowane różnice w kinetykach zaniku przekładały się na wydajność terapii fotouczulanej na komórkach APRE-19 (Szewczyk, Mokrzyński and Sarna, 2024)

Szewczyk, G., Mokrzyński, K. and Sarna, T. (2024) 'Generation of singlet oxygen inside living cells: correlation between phosphorescence decay lifetime, localization and outcome of photodynamic action', *Photochemical & Photobiological Sciences: Official Journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 23(9), pp. 1673–1685. Available at: <https://doi.org/10.1007/s43630-024-00620-8>.

Utlenianie próbników opartych o hydroetydynę przez rodniki o znaczeniu biologicznym – wykrywanie anionorodnika ponadtlenkowego

R. Michalski,¹ R. Podsiadły,² J. Pięta,¹ M. Rostkowski¹

¹ Międzyresortowy Instytut Techniki Radiacyjnej, Wydział Chemiczny, Politechnika Łódzka

² Instytut Technologii Polimerów i Barwników, Politechnika Łódzka, Łódź, Polska

Od czasu odkrycia enzymu dysmutazy ponadtlenkowej, wytwarzanie i los reaktywnych form tlenu w układach biologicznych budzi duże zainteresowanie naukowców z różnych dziedzin nauki – chemii, biologii i medycyny. Zrozumienie specyficznej roli różnych RFT w układach biologicznych wymaga opracowania niezawodnych narzędzi pozwalających na ich selektywne wykrywanie i oznaczanie ilościowe. Większość reaktywnych form tlenu wykazuje wysoką reaktywność w stosunku do składników komórkowych, m.in. białek i tioli. Ze względu na to ich bezpośrednia detekcja w układach biologicznych nie jest możliwa. Jednym z rozwiązań jest zastosowanie próbników fluorescencyjnych. Próbniki fluorescencyjne umożliwiają obserwację powstawania fluorescencyjnych produktów ich reakcji z RFT w układach biologicznych, m.in. w komórkach. W ostatnich latach sondy fluorescencyjne stały się ważnym narzędziem wykorzystywanym w badaniach reaktywnych form tlenu, jednak ich właściwe zastosowanie wymaga dogłębnego zrozumienia mechanizmu ich działania. W niniejszej prezentacji zostaną przedstawione wyniki badań dotyczące chemii próbników opartych o hydroetydynę, przeznaczonych do detekcji anionorodnika ponadtlenkowego.

Methodology of intravital fluorescence visualizations on the example of demonstrating the antithrombotic effect of selected HNO donors in an experimental mouse model

Karol Kramkowski,¹ Joanna Kirmuc,¹ Weronika Zareba,¹ Klaudia Sikorska,¹ Urszula Powierza,¹ Paweł Osiennik,¹ Marta Iwanicka,¹ Karolina Szyszka,¹ Elzbieta Boltromiuk,¹ Tomasz Rusak,¹ Tomasz Misztal,¹ Magdalena Kuckowska,² Paweł Kowalczyk,³ Jakub Pięta,⁴ Adam Sikora,⁴

¹ Department of Physical Chemistry, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

² Experimental Medicine Centre, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

³ Department of Animal Nutrition, The Kielanowski Institute of Animal Physiology and Nutrition, Polish Academy of Sciences, Jabłonna, Poland

⁴ Interdepartmental Institute of Radiation Technology, Lodz University of Technology, Lodz, Poland

Background: HNO (nitroxyl, azanone) is gaseous endogenous moiety reported to possess cardiovascular and antiplatelet effects. Most of HNO donors are water insoluble or show clinically unacceptable kinetics of HNO release. We have synthesized new, water-soluble donors of HNO based on Piloty's Acid (PA) moiety *para*-substituted with carboxyl group (for water solubility) and with Br- or methyl-*ortho*-substituents (regulating HNO release, pH=7.4, 37°C) with $T_{1/2}$ of 2.1 or 42.0 minutes, respectively.

The aim of study: to show antiplatelet activity of newly-synthesized HNO donors: 2-Br-4-COOH-PA (Br-PA) and 2-methyl-4-COOH-PA (CH₃-PA) under in vivo conditions in various time points after intravenous administration in doses of 30 μmol/kg each. Inactivated Br-PA or CH₃-PA or vehicle (Phosphate Buffered 0.9% Saline, PBS, 2 ml/kg) were used as control.

Methods. Laser-induced thrombosis with real-time fluorescent visualization in mesenteric vein of anesthetized Green Fluorescent Protein (GFP) mice (C57BL6-based) was used. Accumulation of GFP platelets represented thrombus volume/area. Additionally, in Br-PA experiment, AnnexinV/Alexa647 (2 μg/g, intravenously) was injected to visualize platelet-exposed phosphatidylserine. Thrombus area and/or annexin fluorescence intensity were quantified with ImageJ software. Thrombi area plotted against time were used to calculate area under the curve (AUC).

Results. Both of tested substances decreased platelet accumulation and platelet accumulation/activation in area of thrombotic laser-induced injury versus VEH or inactivated Br-PA or CH₃-PA in accordance to kinetics of HNO release (Table 1). The effect of short-lasting moiety was more pronounced after 15/35 minutes, while the effects of long-lasting donor were developed 50/65 minutes after administration.

Conclusion. For the first time we have shown intravital antiplatelet and antithrombotic effect of water-soluble PA-based HNO donors. It involves decrease in thrombus volume/area and inhibition of platelet phosphatidylserine expression in the area of thrombosis. The

experiment shows that water-soluble HNO donors are promising precursors for pharmacological platelet inhibition.

Research founded by Polish National Science Centre grant OPUS 2021/43/B/NZ7/01903 and Medical University of Białystok grants B.SUB.23.359 and B.SUB.24.305 and B.SUB.25.300.

Table 1. Antiplatelet effects of 2-F-4-COOH-PA (F-PA) 2-Br-4-COOH-PA (Br-PA). t-Student's or Mann-Whitney (when data deviated from normal distribution) tests were used to evaluate the significance of differences between tested substances and vehicle. Data are presented as mean±SEM; α=5%; *p<0.05; **p<0.01 after 15 or 65 minutes, respectively, n=6-12. AUC, area under the curve.		
Time after iv administration [minutes]	Thrombus volume/area AUC [Green fluorescence, Megapixels in region of interest]	Platelet activation AUC [Red fluorescence, intensity of fluorescence, arbitrary units]
VEH (PBS, 2 ml/kg)		
15 th minute	18.44±2.27	10.66±1.09
65 th minute	17.99±3.01	No data
Br-PA, 30 µmol/kg		
5 th minute	12.55±5.14	8.54±1.71
15 th minute	5.34±1.01**	4.98±2.15*
35 th minute	9.19±3.59*	4.70±2.89*
50 th minute	25.8±5.73	11.38±3.01
65 th minute	20.05±3.13	9.99±2.01
Inactivated Br-PA, 30 µmol/kg		
15 th minute	24.33±7.29	13.01±2.03
CH3-PA, 30µmol/kg		
5 th minute	15.87±4.11	No data
15 th minute	15.42±3.98	No data
35 th minute	16.05±4.80	No data
50 th minute	12.43±1.97*	No data
65 th minute	9.29±2.19*	No data
Inactivated CH3-PA, 30 µmol/kg		
65 th minute	16.10±4.41	No data

Nowe strategie zastępowania konwencjonalnego azotanu (III) sodu w produktach mięsnych przy użyciu różnych donorów tlenu azotu

Marzena Zajac,¹

¹ Katedra Przetwórstwa Produktów Zwierzęcych, Wydział Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Polska

Azotan (III) sodu jest powszechnie stosowanym dodatkiem do mięsa, odpowiedzialnym za charakterystyczną różowoczerwoną barwę po obróbce cieplnej, właściwości organoleptyczne, bezpieczeństwo mikrobiologiczne oraz wydłużoną trwałość produktów. Coraz większe znaczenie zyskuje jednak potrzeba ograniczenia jego stosowania – lub całkowitego wyeliminowania – ze względu na fakt, że pozostałości azotanu (III) pełnią rolę czynnika nitrozującego. W odpowiednich warunkach (np. niskie pH, wysoka temperatura) mogą one prowadzić do powstawania **nitrozoamin**, uznawanych za związki rakotwórcze. W mięsie azotany (III) ulegają redukcji – chemicznej lub enzymatycznej – do tlenu azotu (NO), który wiąże się z żelazem w grupie hemowej mioglobiny, tworząc nitrozyłmioglobinę. Podczas obróbki cieplnej przekształca się ona w nitrozyłhemichromogen, odpowiedzialny za typowy kolor mięsa peklowanego. Część dodanego azotanu reaguje z innymi składnikami mięsa, jednak pewna ilość pozostaje w formie niezwiązanej. Pełni ona funkcję stabilizującą barwę mięsa, ogranicza rozwój mikroorganizmów i zapobiega procesom utleniania.

W ramach projektu badane są trzy alternatywne ścieżki technologiczne, które mogą doprowadzić do częściowego ograniczenia lub całkowitego wyeliminowania dodatku azotanów w przetwórstwie mięsnym. Ze względu na złożony i wielowymiarowy charakter działania tych związków, znalezienie idealnego zamiennika o porównywalnej skuteczności stanowi duże wyzwanie. Pierwsza ścieżka obejmuje testowanie działania syntazy tlenu azotu (NO-syntazy), która – działając na argininę obecną w mięsie lub dodaną – prowadzi do wytworzenia tlenu azotu. Druga ścieżka zakłada bezpośrednie zastosowanie nitrozotoli, takich jak: S-nitrozoacetylocysteina, S-nitrozoglutation oraz etylowy ester S-nitrozoacetylocysteiny. Trzecia ścieżka obejmuje wykorzystanie dinitrozyłowych kompleksów żelaza (DNIC), syntetyzowanych *in situ* i dodawanych do mięsa analogicznie jak nitrozotiole. W trakcie badań oceniany jest wpływ testowanych związków na barwę mięsa i jej stabilność, właściwości przeciwutleniające, stan mioglobiny, a także przeprowadzana jest analiza mikrobiologiczna. Porównania dokonywane są względem próbek mięsa z dodatkiem klasycznego azotanu (III) sodu oraz próbek kontrolnych, bez żadnych dodatków.

Uzyskane dotychczas wyniki wskazują na korzystne działanie nitrozotoli i dinitrozyłowych kompleksów żelaza, co daje podstawy do dalszych badań nad ich potencjalnym zastosowaniem w przemyśle mięsnym jako alternatywy dla azotanów.

Badania w całości finansowane przez Narodowe Centrum Nauki, numer projektu 2022/45/B/NZ9/01840.

Detekcja nadtlenoazotynu powstającego w reakcji dinitrozylowych kompleksów żelaza (DNIC) z anionorodnikiem ponadtlenkowym

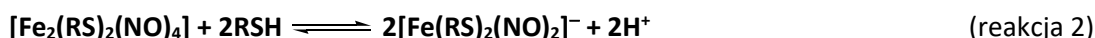
M.Rola,¹ J. Zielonka,² D. Ramos-Truzzi,³ J. Pięta,¹ A. Sikora¹

¹ Międzyresortowy Instytut Techniki Radiacyjnej, Politechnika Łódzka, Łódź, Polska

² Department of Biophysics, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, USA

³ Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Sao Paulo, Brazil

Dinitrozyłowe kompleksy żelaza (DNIC) powstają spontanicznie w wodnych roztworach zawierających jony Fe^{2+} , tlenek azotu ($\cdot\text{NO}$) i różne aniony np. tiolanowe (reakcja 1). Kompleksy te występują w stanie równowagi pomiędzy formami diamagnetycznymi, dimerycznymi (bi-DNIC) a paramagnetycznymi, monomerycznymi (mono-DNIC) (reakcja 2). Grupy tiolanowe (np. w glutationie lub w resztach cysteinowych białek) są najważniejszymi biologicznie anionami koordynującymi jony żelaza w kompleksach DNIC.



W literaturze przedmiotu sugerowano, że niskocząsteczkowe DNIC są ważnymi mediatorami biologii NO w komórkach a obecnie uznaje się, że DNIC są prawdopodobnie najważniejszymi metabolitami tlenu azotu *in vivo*.

Przedstawione zostaną wyniki badań dotyczących reakcji dinitrozylowych kompleksów żelaza (DNIC) z anionorodnikiem ponadtlenkowym ($\text{O}_2^{\cdot-}$), prowadzącej do powstawania nadtlenoazotynu (ONOO^-).

Streszczenia posterów

Charakterystyka nowego, profluorescencyjnego donora HNO – – N-hidroksydansyloamidu

M. Andryszek,¹ R. Smulik-Izydorczyk,¹ J. Pięta,¹ R. Podsiadły,² A. Sikora¹

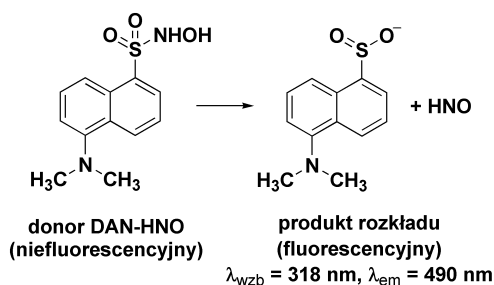
¹ Międzyresortowy Instytut Techniki Radiacyjnej, Politechnika Łódzka, Łódź, Polska

² Instytut Technologii Polimerów i Barwników, Politechnika Łódzka, Łódź, Polska

Azanon (HNO), będący formalnie uprotonowanym produktem jednoelektronowej redukcji tlenku azotu (NO), posiada interesujące właściwości farmakologiczne, które sprawiają, iż jego donory są potencjalnymi środkami terapeutycznymi w chorobach sercowo-naczyniowych. W roztworach wodnych HNO spontanicznie dimeryzuje ze stałą szybkości około $8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, tworząc kwas podazotowy, który następnie rozkłada się do podtlenku azotu i wody (reakcja 1).



Z tego powodu w badaniach chemicznych i biologicznych istnieje konieczność wykorzystania cząsteczek donorowych, uwalniających w kontrolowany sposób HNO. Przedstawione zostaną wyniki badań dotyczących charakterystyki nowego profluorescencyjnego donora HNO, DAN-HNO, który uwalniając HNO przekształca się we fluorescencyjny produkt, pozwalający śledzić proces uwalniania azanonu spektrofotometrycznie.



Photooxidation of a model disulfide peptide: Cystamine

Monika Borkowska¹, Tomasz Pędziński¹

¹ Adam Mickiewicz University, Faculty of Chemistry, Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614, Poznań

Photooxidation and modification of proteins is a common event where proteins are exposed to damaging agents, including heat, UV light and other radiation. Among all the proteins components, the sulfur-containing amino acids, such as cysteine (Cys) and methionine (Met) are the most vulnerable to oxidative damage.[1] Presently the oxidation mechanisms of Cys and Met residues were relatively well studied, resulting in well pictured explanation to the occurring processes, however there is still notable lack of studies on the oxidation and modification of disulfide bonds in cystine, including the factors affecting this process.[2]

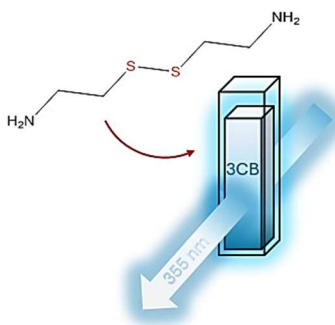


Figure 1. The disulfide peptide model CA (Left) with 3CB under 355nm excitation source

In this work a disulfide model: Cystamine (CA) was exposed to one-electron oxidation with 3-carboxy-benzophenone under 355 nm excitation in both aerobic and anaerobic conditions. Both transient and steady-state products formed during the process were studied with time-correlated single photon counting (TCSPC), laser flash photolysis (LFP), and HPLC-MS. The presence of oxygen seems to have a significant role in the formed stable products and affects directly the oxidation mechanism paths for the disulfide. The results obtained from the experiments and further planned research will provide deeper understanding of disulfides' reactivity in proteins.[3]

Funding: ID-UB Proposals, Applications for funding in the project "Initiative of Excellence - Research University"

References:

- [1] M. J. Davies, "Protein oxidation and peroxidation," *Biochemical Journal*, vol. 473, no. 7. Portland Press Ltd, pp. 805–825, Apr. 01, 2016. doi: 10.1042/BJ20151227
- [2] M. Trujillo, B. Alvarez, and R. Radi, "One- and two-electron oxidation of thiols: mechanisms, kinetics and biological fates," *Free Radic Res*, vol. 50, no. 2, pp. 150–171, Feb. 2016, doi: 10.3109/10715762.2015.1089988
- [3] Q. Gao, K. Grzyb, L. F. Gamon, P. R. Ogilby, T. Pędziński, and M. J. Davies, "The structure of model and peptide disulfides markedly affect their reactivity and products formed with singlet oxygen," *Free Radic Biol Med*, vol. 207, pp. 320–329, Oct. 2023, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2023.08.024

Following the Light: How γ -Glutamylmethionine Turns From Fleeting Radicals into Stable Products in Water

P. Filipiak^{1,2,3}, K. Grzyb², G.L. Hug³, T. Pędziński^{1,2,3}, B. Marciniak^{1,2}

¹ Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University, Poznan, Poland, piotr@amu.edu.pl

² Center for Advanced Technology, Adam Mickiewicz University, Poznan, Poland

³ Notre Dame Radiation Laboratory, Notre Dame University, IN, USA

Gamma-glutamylmethionine (γ -Glu-Met) is a dipeptide composed of gamma-glutamate and methionine. It is biologically relevant, as it can originate from protein digestion or cellular catabolism.

This study investigates the photo-oxidation of γ -Glu-Met using time-resolved laser flash photolysis and high-resolution mass spectrometry. The triplet excited state of 3-carboxybenzophenone was used as a photo-sensitized oxidant under aqueous conditions. Several stable photoproducts were identified and structurally elucidated through MS/MS fragmentation analysis. Time-resolved measurements complemented these findings by providing kinetic and mechanistic insight into the formation and transformation of short-lived intermediates.

Our results demonstrate clear pH-dependent differences in the reaction pathways. Notably, we observed decarboxylation followed by an unexpected intramolecular ring closure, revealing a novel transformation route during the photochemical oxidation of this sulfur-containing peptide.

This work was supported by the National Science Centre, Poland (Grant Number: UMO-2017/27/B/ST4/00375)

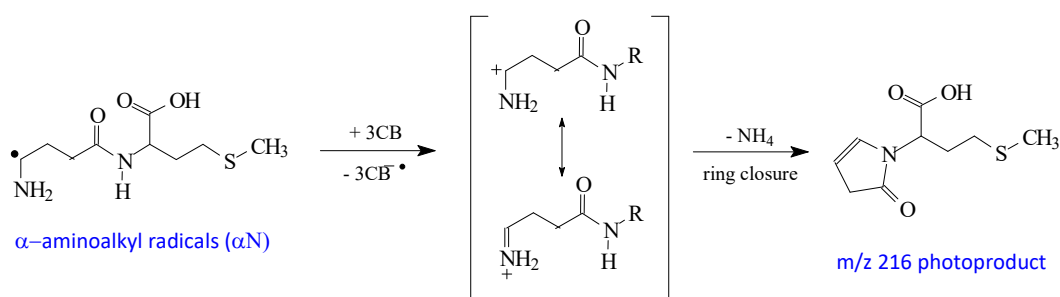


Figure 1. Steady-state product formation following γ -Glu-Met sensitized photo-oxidation reaction – an unexpected intramolecular ring closure.

Ex vivo antiplatelet, eicosanoid pathway-dependent properties of chosen azanone donors in mice and rat models

Joanna Kirmuc,¹ Weronika Zareba,¹ Klaudia Sikorska,¹ Urszula Powierza,¹ Paweł Osiennik,¹ Marta Iwanicka,¹ Karolina Szyszka,¹ Elżbieta Boltromiuk,¹ Tomasz Rusak,¹ Tomasz Misztal,¹ Magdalena Kuckowska,² Paweł Kowalczyk,³ Jakub Pięta,⁴ Adam Sikora,⁴ Karol Kramkowski¹

¹ Department of Physical Chemistry, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

² Experimental Medicine Centre, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

³ Department of Animal Nutrition, The Kielanowski Institute of Animal Physiology and Nutrition, Polish Academy of Sciences, Jabłonna, Poland

⁴ Interdepartmental Institute of Radiation Technology, Lodz University of Technology, Lodz, Poland

Background: HNO donors show cardiovascular and anticoagulant properties. Recently we have synthesized new water-soluble HNO donors based on structure of Piloty's Acid (PA) releasing HNO at pH=7.4, 37°C with half-life of 3.6, 33 or 42 min for 2-Cl-4-COOH-PA (Cl-PA), 2-F-4-COOH-PA (F-PA) and 2-CH₃-4-COOH-PA (CH₃-PA) derivatives, respectively.

Aim: to show antiplatelet activity of new substances and evaluate involvement of eicosanoid pathway inhibition in this action *ex vivo*.

Methods: Green Fluorescent Protein mice (C57BL6-based) were intravenously administered with PBS buffer (control, 2ml/kg) or Cl-PA at doses of 1, 3, 10 or 30 μmol/kg. 10min after blood was collected, then applied by an infusion pump to a collagen-coated chamber (laminar flow, "arterial shear rate" of 1000s⁻¹, 4min) according to our previous reports. The collagen surface containing aggregates was additionally incubated with annexinV/Alexa647 to stain phosphatidylserine (PS) exposed by platelets. Then, the surface was analyzed: the GFP signal of clot-forming platelets aggregates and the red fluorescence signal from PS-exposing-platelets were measured.

Wistar rats were given with PBS (2ml/kg) or F-PA or CH₃-PA at a doses of 1, 3, 10 or 30 μmol/kg, then arterial thrombosis was induced in carotid artery by endothelium electrical damage (1 mA, 10 min). After 50 min of thrombosis progression, blood was collected from the heart, then eicosanoids were generated in aggregation cuvettes by vigorous stirring causing shear stress activating eicosanoid synthesis. Gas conditions in the incubation chamber (80% N₂, 19.5% CO₂, 0.5% O₂) mimic physiological partial pressures. Thromboxane B₂ (TxB₂), stable metabolite of platelet derived/activating TxA₂ of eicosanoid pathway, in the samples were HPLC-analyzed.

Results/conclusions (Table 1): Cl-PA in mice causes significantly decreased platelet accumulation and PS exposition. In turn, in thrombotic rat treated with F-PA or CH₃-PA, eicosanoids synthesis, including TxB₂, is significantly decreased. Taken together, HNO donors exerts strong antiplatelet effect, at least partially dependent on inhibition TxA₂ production.

Research founded: Polish National Science Centre grant 2021/43/B/NZ7/01903.

Table 1. Mice green and red platelet fluorescence intensity after collagen stimulation in flow chamber corresponding to platelet accumulation and platelet PS exposition and TxB ₂ concentrations after <i>ex vivo</i> eicosanoid pathway activation by vigorous stirring in blood of thrombotic rat.). t-Student's or Mann-Whitney (while no normal distribution) tests were used to evaluate the significance of differences between tested substances and vehicle. Data are presented as mean±SEM; *p<0.05; **p<0.01, ***p<0.001 vs VEH.								
	VEH (PBS) 2ml/kg	NaNO ₂ 30 μmol/kg	Cl-PA 30 μmol/kg	Cl-PA 10 μmol/kg	Cl-PA 3 μmol/kg	Cl-PA 1 μmol/kg	F-PA 30 μmol/kg	CH ₃ -PA 30 μmol/kg
Mice green platelet fluorescence	41.79 ±3.77	-	6.80 ±1.33 ***	6.76 ±2.57**	10.35 ±1.28**	6.38 ±0.79***	-	-
Mice red platelet fluorescence	32.07 ±1.52	-	15.12 ±0.76***	19.95 ±0.90*	25.6 ±1.41*	17.61 ±1.30***	-	-
TxB ₂ concentration in blood of thrombotic rat [μg/ml]	0.15 ±0.02	0.03 ±0.02*	-	-	-	-	0.01 ±0.002*	0.016 ±0.01*

Antithrombotic effects of new nitroxyl donors in egfp mice in intravital method

Karol Kramkowski,¹ Joanna Kirmuc,¹ Weronika Zareba,¹ Klaudia Sikorska,¹ Urszula Powierza,¹ Paweł Osiennik,¹ Marta Iwanicka,¹ Karolina Szyszka,¹ Elzbieta Boltromiuk,¹ Tomasz Rusak,¹ Tomasz Misztal,¹ Magdalena Kuckowska,² Paweł Kowalczyk,³ Jakub Pieta,⁴ Adam Sikora,⁴

¹ *Department of Physical Chemistry, Medical University of Białystok, Białystok, Poland*

² *Experimental Medicine Centre, Medical University of Białystok, Białystok, Poland*

³ *Department of Animal Nutrition, The Kielanowski Institute of Animal Physiology and Nutrition, Polish Academy of Sciences, Jabłonna, Poland*

⁴ *Interdepartmental Institute of Radiation Technology, Lodz University of Technology, Lodz, Poland*

Background: HNO (nitroxyl, azanone) is gaseous endogenic moiety reported to possess cardiovascular and antiplatelet effects. Most of HNO donors are water insoluble or show clinically unacceptable kinetics of HNO release. We have synthesized new, water-soluble donors of HNO based on Piloty's Acid (PA) moiety *para*-substituted with carboxyl group (for water solubility) and with Br- or methyl-*ortho*-substituents (regulating HNO release, pH=7.4, 37°C) with T_{1/2} of 2.1 or 42.0 minutes, respectively.

The aim of study: to show antiplatelet activity of newly-synthesized HNO donors: 2-Br-4-COOH-PA (Br-PA) and 2-methyl-4-COOH-PA (CH₃-PA) under in vivo conditions in various time points after intravenous administration in doses of 30 μmol/kg each. Inactivated Br-PA or CH₃-PA or vehicle (Phosphate Buffered 0.9% Saline, PBS, 2 ml/kg) were used as control.

Methods. Laser-induced thrombosis with real-time fluorescent visualization in mesenteric vein of anesthetized Green Fluorescent Protein (GFP) mice (C57BL6-based) was used. Accumulation of GFP platelets represented thrombus volume/area. Additionally, in Br-PA experiment, AnnexinV/Alexa647 (2 μg/g, intravenously) was injected to visualize platelet-exposed phosphatidylserine. Thrombus area and/or annexin fluorescence intensity were quantified with ImageJ software. Thrombi area plotted against time were used to calculate area under the curve (AUC).

Results. Both of tested substances decreased platelet accumulation and platelet accumulation/activation in area of thrombotic laser-induced injury versus VEH or inactivated Br-PA or CH₃-PA in accordance to kinetics of HNO release (Table1). The effect of short-lasting moiety was more pronounced after 15/35 minutes, while the effects of long-lasting donor were developed 50/65 minutes after administration.

Conclusion. For the first time we have shown intravital antiplatelet and antithrombotic effect of water-soluble PA-based HNO donors. It involves decrease in thrombus volume/area and inhibition of platelet phosphatidylserine expression in the area of

thrombosis. The experiment shows that water-soluble HNO donors are promising precursors for pharmacological platelet inhibition.

Research founded by Polish National Science Centre grant OPUS 2021/43/B/NZ7/01903 and Medical University of Bialystok grants B.SUB.23.359 and B.SUB.24.305 and B.SUB.25.300.

Table 1. Antiplatelet effects of 2-F-4-COOH-PA (F-PA) 2-Br-4-COOH-PA (Br-PA). t-Student's or Mann-Whitney (when data deviated from normal distribution) tests were used to evaluate the significance of differences between tested substances and vehicle. Data are presented as mean±SEM; α=5%; *p<0.05; **p<0.01 after 15 or 65 minutes, respectively, n=6-12. AUC, area under the curve.		
Time after iv administration [minutes]	Thrombus volume/area AUC [Green fluorescence, Megapixels in region of interest]	Platelet activation AUC [Red fluorescence, intensity of fluorescence, arbitrary units]
VEH (PBS, 2 ml/kg)		
15 th minute	18.44±2.27	10.66±1.09
65 th minute	17.99±3.01	No data
Br-PA, 30 µmol/kg		
5 th minute	12.55±5.14	8.54±1.71
15 th minute	5.34±1.01**	4.98±2.15*
35 th minute	9.19±3.59*	4.70±2.89*
50 th minute	25.8±5.73	11.38±3.01
65 th minute	20.05±3.13	9.99±2.01
Inactivated Br-PA, 30 µmol/kg		
15 th minute	24.33±7.29	13.01±2.03
CH3-PA, 30µmol/kg		
5 th minute	15.87±4.11	No data
15 th minute	15.42±3.98	No data
35 th minute	16.05±4.80	No data
50 th minute	12.43±1.97*	No data
65 th minute	9.29±2.19*	No data
Inactivated CH3-PA, 30 µmol/kg		
65 th minute	16.10±4.41	No data

Antithrombotic effect of novel HNO-releasing Piloty's acid derivatives and its comparison with NO donor

Weronika Zareba¹, Joanna Kirmuć¹, Klaudia Sikorska¹, Urszula Powierża¹, Paweł Osiennik¹, Magdalena Kućkowska², Marta Iwanicka¹, Karolina Szyszka¹, Elżbieta Bołtromiuk¹, Paweł Kowalczyk³, Tomasz Misztal¹, Tomasz Rusak¹, Jakub Pięta⁴, Adam Sikora⁴, Karol Kramkowski¹

¹ Department of Physical Chemistry, Medical University of Białystok, Mickiewicza 2A, 15-089 Białystok, Poland

² Experimental Medicine Centre, Skłodowskiej-Curie 24, 15-369 Białystok

³ Department of Animal Nutrition, The Kielanowski Institute of Animal Physiology and Nutrition, Polish Academy of Sciences, 05-110 Jabłonna, Poland.

⁴ Institute of Applied Radiation Chemistry, Lodz University of Technology, Wroblewskiego 15, 93-590 Lodz, Poland.

Background: Cardiovascular diseases, including thromboembolism, account for the highest percentage of deaths worldwide. Therefore, the search for new, more effective antiplatelet drugs is essential. New HNO-releasing derivatives of Piloty's acid show beneficial effects on the circulatory system and may be a therapeutic option for thrombotic complications of various civilization diseases.

The aim of this study was to evaluate the antithrombotic properties of novel water-soluble HNO donors. These are Piloty's acid derivatives *ortho*-substituted by fluorine or bromine atoms and *para*-substituted by a carboxyl group (to improve their water solubility): 2-F-4-COOH-PA (F-PA) and 2-Br-4-COOH-PA (Br-PA). These donors release HNO in aqueous solutions at pH 7.4 and 37°C, with T_{1/2} = 42.0 min and 2.1 min, respectively.

Methods: We used method of electrically-induced thrombosis in Wistar rat carotid artery with ex vivo evaluation of collagen-induced platelet aggregation in whole blood (impedance method). Classical coagulology parameters (PT, aPTT, TT, Fibrinogen level) and blood cell count were also evaluated. F-PA, Br-PA (1, 3, 10, 30 µmol/kg), acetylsalicylic acid (ASA, 150 mg/kg), sodium nitrite (15 µmol/kg, an inorganic NO donor) and PBS buffer (VEH, 2 ml/kg) were administered iv 10 min before the stimulation (1 mA, 10 min). After 50 min of thrombosis progression clot was extracted and weighed after 24 hours.

Results: F-PA and Br-PA decreased arterial thrombus weight in a dose-dependent manner and in some groups decreased aggregation. Antithrombotic effect is of similar potency to ASA and nitrite (Table 1). No statistically significant changes were observed in blood cell count and coagulology parameters.

In conclusion, for the first time we have shown antithrombotic effect of water soluble Piloty's acid-based HNO donors. It involves platelet inhibition, but not blood coagulation cascade inhibition. Further research into other such derivatives and their mechanisms of action is fully warranted to create advances in area of drug candidates for thromboembolism treatment.

Table 1. Antithrombotic and antiplatelet effects of 2-F-4-COOH-PA (F-PA) 2-Br-4-COOH-PA (Br-PA) and acetylsalicylic acid (ASA), and sodium nitrite. We used Mann-Whitney test, while the results are reported as mean±SEM; *p<0.05; **p<0.01 vs VEH, n=8-12.

	VEH	ASA 150 mg /kg	nitrite 15 µmol /kg	F-PA 1 µmol /kg	F-PA 3 µmol /kg	F-PA 10 µmol /kg	Br-PA 1 µmol /kg	Br-PA 3 µmol /kg	Br-PA 10 µmol /kg	Br-PA 30 µmol /kg
Arterial thrombus weight [mg]	0.98± 0.05	0.67± 0.11*	0.61± 0.15*	0.84± 0.09	0.73± 0.05**	0.71± 0.10*	0.57± 0.02**	0.69± 0.11*	0.63± 0.09**	0.63± 0.07**
Whole blood platelet aggregation maximal amplitude at 6th min. of aggregation curve [Ω]	5.28± 0.51	2.91± 0.70**	No data	2.03± 0.63**	3.22± 0.43*	No data	4.77± 1.30	3.73± 0.44	3.62± 1.18	2.18± 0.74*