



Dr hab. inż. Dariusz Pogocki, Prof. UR.

Rzeszów, 14.01.2019

Recenzja rozprawy doktorskiej

*Mgr inż. Renaty Smulik-Izydorzycyk*

**pt. „Charakterystyka reaktywności azanonu (HNO)  
i wybranych jego donorów”**

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Renaty Smulik-Izydorzycyk została wykonana w Międzyresortowym Instytucie Techniki Radiacyjnej Politechniki Łódzkiej pod opieką promotora prof. dr hab. inż. Andrzeja Marcinka i promotora pomocniczego dr inż. Adama Sikory.

Autorka rozprawy wykorzystała ustawową możliwość prezentowania dorobku objętego jej doktoratem w formie, opatrzonego obszernym wstępem („autoreferatem”) 59 stron i 10 stronicowym podsumowaniem, zestawu czterech wieloautorskich publikacji wydanych w renomowanych, interdyscyplinarnych czasopismach z obszaru pogranicza chemii, biologii i nauk medycznych (*J. Biol. Chem., Nitric Oxide, Arch. Biochem. Biophys., Free Radical. Biol. Med.*).

Badania przedstawione w prezentowanej rozprawie prowadzone były w ramach następujących projektów: (i) „*Śródbłonek naczyniowy w chorobach cywilizacyjnych: od badań podstawowych do oferty innowacyjnego leku o działaniu śródbłonkowym*”, koordynowanego przez Jagiellońskie Centrum Rozwoju Leków i współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach programu operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, (ii) „*Od selektywnej detekcji biologicznych utleniaczy i małowcząsteczkowych związków sygnałowych do lepszego rozpoznania ich chemii biologicznej*”, realizowanego w ramach projektu SONATA BIS Narodowego Centrum Nauki, (iii) „*Zależność reaktywności HNO względem tioli od pH środowiska reakcji*”, oraz (iv) „*Wpływ modyfikowanych cyklodekstryn na kinetykę rozkładu donorów azanonu*”.

(HNO)” finansowanych z Funduszu Młodych Naukowców Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej.

Jakkolwiek autorka ubiega się o stopień doktora nauk chemicznych to tematyka pracy, źródła finansowania i współpraca naukowa wskazują na jej interdyscyplinarny charakter. Przeprowadzone przez autorkę badania można zakwalifikować do badań podstawowych, ale ich rezultaty powinny zainteresować szersze grono biologów i chemików, a przede wszystkim przedstawicieli nauk medycznych i farmaceutycznych, gdyż wkraczają one w obszar tzw. medycyny translacyjnej przekształcającej obiecujące odkrycia laboratoryjne w zastosowania kliniczne i próbującej odpowiedzieć na pytania kliniczne.

Zgodnie z tytułem, *Charakterystyka reaktywności azanonu (HNO) i wybranych jego donorów* prezentowana praca dotyczy aktywności tego krótkożyciowego indywiduum chemicznego, którego skomplikowana chemia biologiczna pozostaje wciąż ostatecznie nierozpoznana. Zwłaszcza jeśli porówna się ją z chemią tlenku azotu NO, którego azanon (HNO) jest zredukowanym i protonowanym produktem.

W ostatnich latach w literaturze opisano istotne efekty farmakologiczne azanonu i jego donorów, świadczące, iż mogą one być stosowane w leczeniu chorób związanych z układem sercowo-naczyniowym, powodując między innymi hamowanie agregacji płytek krwi, wzmocnienie siły skurczu serca i wydłużenie rozkurczu serca. A także, co ciekawe, donory azanonu wydają się być obiecującymi środkami terapeutycznymi stosowanymi do kontroli bólu o różnorodnym podłożu, w tym w łagodzeniu przewlekłych bólów neuropatycznych spowodowanych urazami oraz bólu towarzyszącego infekcyjnemu zapaleniu stawów, wywołanemu przez bakterie gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*). Informacje dotyczące biologicznych właściwości azanonu i jego donorów autorka rozprawy przedstawia w zwięzłym przeglądzie literaturowym (str.15-42), tam też znajduje się przegląd podstawowych informacji dotyczących reaktywności azanonu i oraz chemii związków, które są stosowane lub rozważane do stosowania jako jego źródła w terapii.

Ostatni, wydaje się, że najbardziej krytyczny, podrozdział przeglądu literaturowego dotyczy metod detekcji azanonu. Autorka rozprawy wskazuje w nim na wady i zalety stosowanych w praktyce laboratoryjnej próbników HNO, odsyłając bardziej zainteresowanego czytelnika do artykułu przeglądowego (publikacja nr 4: Fluorescent probes for the detection of nitroxyl (HNO), *Free Radical Biol. Med.* (2018), 128, 69-83), którego jest współautorem. Z lektury tego artykułu i całego zamieszczonego w pracy przeglądu literaturowego, jednoznacznie wynika, iż trudności związane z detekcją azanonu są „wąskim gardłem” badań prowadzących do otrzymania jego nowych, skutecznych i bezpiecznych donorów.

Lektura tej części pracy sprawia, iż autorka rozprawy w zasadzie nie musi szczegółowo uzasadniać celowości prowadzonych przez siebie badań, którym poświęcona została prezentowana rozprawa. Nie wnoszę do tego rozdziału większych zastrzeżeń - została ona napisana w sposób niewątpliwie kompetentny, usystematyzowany i pomimo złożoności problemu bardzo przejrzysty. Aczkolwiek, czytając tę część pracy, będąc chemikiem, w kilku momentach poczułem się nieswojo napotykać na nieznane mi wcześniej a niewyjaśnione od razu w tekście, terminy medyczne jak np. „*odwrotny efekt w reperfuzji niedokrwiennej serca*”.

Zgodnie z zawartą w punkcie „*Cel i zakres pracy*” deklaracją autorki: prezentowana rozprawa została poświęcona rozwinięciu prac badawczych dotyczących reaktywności azanonu, które zapoczątkowane zostały w MITR PŁ przez promotora pomocniczego doktoratu dr. inż. Adama Sikorę. W ramach pracy opracowano metodę badań kinetycznych, która pozwoliła określić reaktywność azanonu względem jego wybranych zmiataczy: tlenu cząsteczkowego, hydroksyloaminy, jonów azotanowych (III), związków tiolowych, związków arylonitrozowych oraz fosfin aromatycznych. W ramach prezentowanej pracy scharakteryzowano także kinetykę uwalniania HNO z wybranych związków donorowych azanonu: 2-podstawionych N-hydroksybenzenosulfonamidów, (pochodnych kwasu Piloty'ego). W badaniach biologicznych donory te stanowią alternatywę dla najczęściej stosowanej soli Angeliego.

Główną techniką eksperymentalną wykorzystywaną w pracy była technika zatrzymanego przepływu (ang. *stopped-flow*), służąca do badania przebiegu szybkich reakcji w czasie rzeczywistym.

Posługując się tą techniką, do wyznaczenia poszukiwanych stałych szybkości autorka wykorzystwała powszechnie używaną w badaniach kinetycznych metodykę reakcji konkurujących. Metodyka ta jest szczególnie użyteczna w sytuacji gdy badacz nie może posłużyć się technikami pomiaru umożliwiającymi bezpośrednie śledzenie zaniku substratów bądź powstawania produktów, a z takimi przypadkami autorka miała do czynienia w swojej pracy.

Oryginalnym osiągnięciem badawczym autorki było opracowanie metodyki wykorzystującej reakcje konkurujące do wyznaczenia drugorzędowej stałej szybkości reakcji HNO z O<sub>2</sub>. W swoim podejściu autorka wykorzystwała próbники boronowe, które stosunkowo szybko ( $k \sim 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) reagują z powstającym w reakcji HNO z O<sub>2</sub> nadtlenoazotynem (ONOO<sup>•</sup>) dając barwne i fluoryzujące produkty (ester metylowy fluoresceiny, 7-hydroksykumaryna, rezorufina) monitorowane za pomocą technik spektrofluorymetrycznych. Opracowana metoda opiera się na porównaniu szybkości utlenienia próbника boronowego w układzie zawierającym donor HNO, związek boronowy oraz wybrane zmiatacze HNO, dla których stałe szybkości reakcji z azanonem znane były wcześniej. W badaniach,

jako donor HNO zastosowano sól Angeliego o znanej szybkości powstawania HNO w warunkach pomiaru. Korzystając z wyznaczonej tą drogą stałej szybkości reakcji HNO z O<sub>2</sub> autorka wyznaczyła stałe szybkości reakcji azonanu z szeregiem niskocząsteczkowych związków tiolowych oraz z albuminami osocza krwi, ludzkiego (HSA) i wołowego (BSA). Konieczne było tutaj staranne monitorowanie odczynu pH a także uwzględnienie w rozważaniach kinetycznych dość złożonego systemu równowag kwasowo-zasadowych reagentów, co się udało autorce w zupełności. (W ramach realizowanych przez autorkę projektów przebadano także reaktywność HNO względem wybranych związków nieorganicznych, nitrozowych, arylofosfinowych, rodników nitroksylowych oraz benzenosulfonianów. W badaniach tym razem wykorzystano boronową pochodną rezorufiny PC1.)

Oddzielną część pracy stanowią badania dotyczące pochodne kwasu Piloty'ego – szczególnie obiecującej klasą związków, donorów azonanu, w przypadku których szybkość uwalniania HNO można modulować poprzez odpowiednią modyfikację podstawnika w pierścieniu aromatycznym. W stanowiącym część rozprawy artykule przedstawiona została charakterystyka reaktywności trzech pochodnych kwasu Piloty'ego podstawionych w pozycji orto- chlorem, bromem oraz grupą trifluorometylową. Podjęto tutaj próbę wyjaśnienia jak wspomniane modyfikacje strukturalne kwasu Piloty'ego wpłynęły na kinetykę uwalniania azonanu z cząsteczki donoru. Dzięki wykorzystaniu odpowiednich próbników boronowych oznaczono odpowiednie stałe szybkości rozkładu w pH fizjologicznym oraz stałe szybkości reakcji odwrotnej, w której odtwarzany jest związek donorowy, a także scharakteryzowano wpływ pH oraz temperatury na ich rozkład.

Podsumowując, uważam że metody eksperymentalnie zostały dobrze i starannie dobrane a autorka bardzo dobrze je wykorzystwała. Skala czasowa badanych procesów pozwoliła autorce na wykorzystanie metody zatrzymanego przepływu z detekcją spektrofluorymetryczną. Wykorzystując metody eksperymentalne doktorantka wykazała się dużą pomysłowością. Interpretując swoje wyniki autorka przeprowadziła ponadto symulacje kinetyki reakcji konkurujących a także wykorzystwała wyniki obliczeń kwantowo-mechanicznych, co uważam za bardzo cenne.

Cele badawcze osiągnięto stosunkowo prostymi środkami w oparciu o bardzo dobre rozeznanie literaturowe i doświadczenie członków zespołu badawczego, w którym doktorantka pracowała, a także zespołów z którymi współpracowała.

Sądzę, że autorce udało się zrealizować postawione cele badawcze i zweryfikować stawiane hipotezy. W pełni zgadzam się z wnioskami wyprowadzonymi na podstawie bogatego materiału doświadczalnego. Za szczególnie wartościową uważam ocenę wpływu modyfikowanych  $\beta$ -cyklodekstryn na kinetykę rozkładu donorów azonanu i ocenę możliwości zastosowania tak

skompleksowanych związków do badań antyagregacyjnych właściwości HNO - badaniami tymi autorka uczyniła pierwsze kroki w kierunku formułacji terapeutyków opartych o donory HNO.

Jak każda dobra rozprawa naukowa również i ta skłania do pewnych uwag i komentarzy, które w skrótovej formie przedstawię poniżej:

(i) W odróżnieniu od nieorganicznej soli Angeliego badane w pracy donory HNO (tj. 2-podstawione N-hydroksybenzenosulfonamidy, pochodne kwasu Piloty'ego) to związki organiczne i do tego aromatyczne. (Autorka wykorzystuje te właściwości do tworzenia związków inkluzyjnych tych donorów.) Przypuszczam, że po wprowadzaniu do organizmu w znacznych stężeniach terapeutycznych (zwłaszcza w postaci niezwiązanej) ich dystrybucja nie będzie homogeniczna a będą się one wiązać w komórkach ze strukturami lipofilowymi. Należy się spodziewać ich powinowactwa do tkanki tłuszczowej a także do większości receptorów i enzymów posiadających centra hydrofobowe. Jaki to może mieć wpływ na skuteczność terapii?

(ii) Wydzielaniu HNO przez w/w donory będzie towarzyszyło powstawanie stosunkowo prostych związków aromatycznych o charakterze lipofilowym. Czy znane są produkty metabolizmu i ewentualna cytotoksyczność i kancerogenność tych cząsteczek?

(iii) Zarówno pochodne kwasu Piloty'ego jak i ich aromatyczne metabolity będą efektywnymi zmiataczami rodników wpływając przez to na poziom stresu oksydacyjnego. Jakie mogą być tego konsekwencje w przypadku chorób, które zamierzamy nimi leczyć? Na ile np. jedno-elektronowa redukcja niektórych z nich z lokalnym wydzieleniem anionów chlorkowego lub bromkowego może wpływać na przebieg choroby i skuteczność terapii?

(iv) Czy znane są jakieś charakterystyczne dla HNO modyfikacje aminokwasów, które mogłyby zostać wykryte po sekwencjonowaniu białek?

Jedynie z ciekawości wynika dodatkowe pytanie:

(v) Czy i jak autorka wyobraża sobie przeprowadzenie eksperymentu wyznaczenia stałej szybkości reakcji HNO z tlenem singletowym?

Podczas publicznej obrony pracy oczekuję komentarza autorki do zasygnalizowanych problemów.

Należy podkreślić, że rozprawa została bardzo starannie wyedytowana za co należą się autorce słowa uznania. Sprawia to jednocześnie, że nie udało mi się odnaleźć istotnych uchybień w korekcie manuskryptu.

Wymienione pytania i uwagi do rozprawy nie umniejszają w istotny sposób wartości rozprawy doktorskiej, którą oceniam bardzo wysoko. Autorka w pełni osiągnęła nakreślone cele badawcze i podbudowała wyniki solidną interpretacją, ucząc się przy tym także bardzo wiele. Dobrze się stało, że większość uzyskanych przez autorkę wyników została przedstawiona międzynarodowemu środowisku naukowemu w formie artykułów opublikowanych w renomowanych czasopismach, co powinno znacząco zwiększyć grono ich odbiorców. Chciałbym tutaj dodać, że wiedzę uzyskaną podczas lektury recenzowanej rozprawy oraz towarzyszących jej publikacji będę próbował wykorzystać w mojej pracy dydaktycznej w Uniwersytecie Rzeszowskim.

Jako członek Rady Redakcyjnej *Wiadomości Chemicznych* PTChem gorąco zachęcam autorkę do opublikowania tamże pracy przeglądowej skierowanej do czytelnika polskiego. Szczególnie zachęcam także do zaprezentowania podobnego opracowania skierowanego tym razem do polskiego środowiska medycznego np. w wydawnictwie Termedia.

Reasumując stwierdzam, że recenzowana rozprawa spełnia przepisane ustawą wymagania stawiane pracom doktorskim. Upoważnia mnie to do postawienia wniosku o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie pani mgr inż. *Renaty Smulik-Izydorzyc* do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Całość realizowanego przez autorkę projektu naukowego, którego podsumowaniem jest recenzowana rozprawa, pokazuje zaangażowanie badawcze doktorantki, co bardzo dobrze wróży jej przyszłości naukowej. Uważam także, iż recenzowana rozprawa zasługuje na wyróżnienie przez Radę Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej. Moim zdaniem takie wyróżnienie pracy pani mgr inż. *Renaty Smulik-Izydorzyc* powinno pomóc doktorantce w podjęciu decyzji o dalszym rozwoju naukowym.

Dariusz Fogochi