



Dr hab. Ewa Słomińska
Katedra i Zakład Biochemii
eslom@gumed.edu.pl

Gdańsk, 2019.01.09

**Dziekan Wydziału Chemicznego
Politechniki Łódzkiej
Prof. dr hab. inż. Małgorzata I. Szyrkowska**

Recenzja

rozprawy doktorskiej **mgr inż. Renaty Smulik-Izidorczyk** pt. „Charakterystyka reaktywności azanonu (HNO) i wybranych jego donorów”

Temat przesłanej do oceny rozprawy doktorskiej jest aktualny i ważny ze względów poznawczych. Dotyczy bowiem badań nad określeniem reaktywności azanonu i jego donorów. Temat jest interesujący nie tylko z punktu chemicznego, ale także i medycznego. Azanon (HNO), nazywany także nitroksylem lub wodorkiem nitrozyłu, jest cząsteczką o właściwościach wazodylatacyjnych. Z tego też powodu związki, które mogą być donorami tej cząsteczki wzbudzają duże zainteresowanie jako potencjalne leki w chorobach sercowo-naczyniowych. W piśmiennictwie wykazano, że HNO uwolniony z najlepiej dotąd poznanego donora – soli Angeliego, wykazuje efekt wzmacniający siłę skurczu mięśnia sercowego, a także ułatwia rozkurcz serca. Co więcej, zauważono przydatność tego związku w leczeniu kardiomiopatii cukrzycowej czy ochronie mięśnia sercowego w czasie reperfuzji. Dodatkowo HNO efektywnie hamuje agregację płytek krwi. Jednak pomimo badań prowadzonych przez wiele grup naukowców nadal jest wiele znaków zapytania co do reaktywności i właściwości biologicznych azanonu. Tak naprawdę dotąd nie wiadomo, czy azanon powstaje *in vivo*. Spowodowane to jest na pewno niezwykle wysoką reaktywnością HNO i brakiem selektywnych narzędzi do jego detekcji.

Tematyka badań i prezentowane w tej rozprawie wyniki są kontynuacją i rozwinięciem badań realizowanych w Międzyresortowym Instytucie Techniki Radiacyjnej Politechniki Łódzkiej przez zespół prof. dr hab. inż. Andrzeja Marcinka, promotora rozprawy oraz dr inż. Adama Sikory.

W przedstawionej rozprawie mgr inż. Renata Smulik-Izidorczyk podjęła się niezwykle trudnego zadania – opracowania metody badań kinetycznych pozwalającej na określenie reaktywności azanonu względem wybranych zmiataczy a także wyznaczenia kinetyki uwalniania HNO z pochodnych kwasu Piloty'ego. Wszystkie postawione cele badawcze zostały zrealizowane, a uzyskane wyniki opublikowane w prestiżowych międzynarodowych czasopismach: *The Journal of*



Biological Chemistry, Nitric Oxide, Archives of Biochemistry and Biophysics, Free Radical Biology and Medicine. Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF) tych publikacji wynosi ponad 18. Jest to ogromne osiągnięcie Doktorantki, tym bardziej, że w każdej z tych publikacji jest pierwszym autorem. Ponadto na podstawie przedstawionych przez współautorów publikacji oświadczeń wynika, że mgr inż. Renata Smulik- Izydorczyk we wszystkich pracach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej miała wiodący wkład w ich powstanie.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska zawiera *Spis treści, Wykaz skrótów, Wstęp, Cel i zakres pracy, Omówienie celu naukowego publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej i uzyskanych wyników, Publikacje, Oświadczenia współautorów, Podsumowanie i wnioski, Streszczenie, Bibliografię.*

Wstęp obejmujące 27 stron. Przedstawiono w nim wyczerpujące kompendium wiedzy o azanie, jego właściwościach biologicznych, drogach powstawania, reaktywności. Przedstawiono także znane donory azanonu. Omówiono metody detekcji tego związku. Doktorantka w pracy przeglądowej opublikowanej w 2018 roku w prestiżowym czasopiśmie *Free Radical Biology and Medicine* o IF ponad 6 (wchodzącym w skład rozprawy doktorskiej) przedstawiła w wyczerpujący sposób wady i zalety próbników stosowanych do detekcji HNO. Świadczy to o dużej dojrzałości naukowej i znajomości tematu.

Postawione cele są sformułowane w sposób prawidłowy.

Biorąc pod uwagę metodykę pracy, to Doktorantka do realizacji założonych celów badawczych zastosowała wiele złożonych i nowoczesnych technik badawczych, w tym: metod fluorescencyjnych, spektrofotometrycznych, chromatograficznych a także techniki zatrzymanego przepływu. W czasie swojej pracy opracowała także metodę reakcji konkurencyjnych, którą wykorzystywała do określenia reaktywności azanonu względem tlenu cząsteczkowego, ważnych biologicznie związków tiolowych, a także pochodnych kwasu Piloty'ego. Na uwagę zasługuje fakt, że metoda ta została zweryfikowana opracowanym modelem kinetycznym w oparciu o symulację komputerową. Metoda ta i jej przydatność w badaniach została opisana w 2014 roku w pracy wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej i opublikowanej w prestiżowym czasopiśmie, zaliczanym do najwyższej kategorii czasopism Q1, *The Journal of Biological Chemistry*. Opracowana metoda stanowiła punkt wyjścia do uzyskania następujących interesujących wyników o właściwościach azanonu i jego donorów, zamieszczonych w dwóch kolejnych publikacjach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, a opublikowanych w bardzo dobrych czasopismach międzynarodowych: *Nitric Oxide, Archives of Biochemistry and Biophysics*.

Wyniki badań, zarówno ryciny jak i ich opis są przedstawione poprawnie i czytelnie. Dotyczy to wyników zamieszczonych we wszystkich publikacjach, jak i przestawionych w rozprawie, a



stanowiących rozszerzenie podjętej tematyki. Sposób przeprowadzenia doświadczeń jest poprawny i nie nasuwa uwag krytycznych.

Równocześnie z przedstawionymi rezultatami badań przeprowadzona jest dyskusja wyników. Jest ona ciekawa i dobrze napisana. Oceniając dyskusję mogę stwierdzić, że otrzymane wyniki zostały przez Doktoranta dobrze przedyskutowane i skonfrontowane z danymi z piśmiennictwa, a ich interpretacja jest wnikliwa i ostrożna. Świadczy to o dobrej znajomości poruszanej w rozprawie problematyki oraz dobrej znajomości piśmiennictwa w zakresie prowadzonych badań.

Na zakończenie zostały przedstawione najważniejsze wnioski z uzyskanych wyników. Wnioski są prawidłowo sformułowane i w pełni udokumentowane wynikami przeprowadzonych doświadczeń. W ocenie recenzenta na podstawie przedstawionych publikacji i zamieszczonych w rozprawie wyników do najważniejszych osiągnięć Doktorantki należy:

- 1) opracowanie uniwersalnej metody wyznaczenia stałych szybkości reakcji azanonu z wykorzystaniem próbników boronowych
- 2) oszacowanie stałej szybkości reakcji HNO z tlenem cząsteczkowym na $1,8 \pm 0,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
- 3) wyznaczenie wartości stałych szybkości reakcji HNO z jego zmiataczami (w tym z ważnymi biologicznie związkami tiolowymi (np. cysteina, glutationem, N-acetylocysteina, siarkowodorem), albuminą, wybranymi związkami nieorganicznymi, anionami benzenosulfonianowymi, związkami nitrozowymi, arylofosfinowymi, rodnikami nitroksylowymi)
- 4) wykazanie, że pochodne kwasu Piloty'ego z podstawnikami w pozycji orto- w warunkach fizjologicznych są zdolne do uwalniania HNO. Wśród przebadanych związków najbardziej obiecującą do zastosowania w warunkach fizjologicznych jest podstawiona w pozycji orto – atomem bromu pochodna kwasu Piloty'ego
- 5) wykazanie, że kompleks modyfikowanych β -cyklodekstryn z pochodnymi kwasu Piloty'ego wykazuje właściwości antyagregacyjne

Jako recenzent mam kilka pytań do Doktorantki:

- czy w warunkach fizjologicznych u ludzi jest możliwe powstawanie azanonu, i co mogłoby być jego donorem/prekursorem
- dlaczego w badaniach zastosowano niefizjologiczne stężenia badanych związków tiolowych (np. glutationu), czy albuminy

Na koniec chciałabym zwrócić uwagę na stosowanie poprawnych określeń, i tak:

- na str. 18 jest w odniesieniu do CGRP jest rozwinięcie tego skrótu jako „peptyd związany z genem kalcytoniny” a jest to poprawnie peptyd pochodny genu kalcytoniny
- na str. 20 jest „działanie krytycznych związków tiolowych” – chodzi chyba o ważne biologicznie związki zawierające siarkę



- na str. 21 – czy drugi etap reakcji syntezy HNO z argininy nie wymaga tlenu i NADPH? Ponadto pierwszy etap tej reakcji też jest syntetyzowany przez syntazę tlenu azotu
- str 24 – użyto określenia „azazon inhibituje”, a powinno być – hamuje (albo spotykane, ale w języku polskim niepoprawne inhibuje)

Niemniej jednak te drobne niedociągnięcia nie umniejszają wartości uzyskanych interesujących wyników dotyczących charakterystyki reaktywności azanonu i wybranych jego donorów.

W podsumowaniu stwierdzam, że mgr inż. Renata Smulik - Izydorczyk jest w pełni ukształtowanym pracownikiem naukowym, posługującym się wieloma technikami badawczymi, zdolnym do rozwiązywania skomplikowanych problemów. Jej rozprawa doktorska ma charakter oryginalnej, bardzo dobrej pracy doświadczalnej spełniającej wszelkie kryteria stawiane rozprawom doktorskim. Dlatego też zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej o dopuszczenie mgr inż. Renaty Smulik - Izydorczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie biorąc pod uwagę doskonały warsztat doświadczalny Doktorantki, co jest unikalne na tym etapie rozwoju naukowego oraz opublikowanie już znaczącej większości uzyskanych wyników w prestiżowych czasopismach z dziedziny biologii, chemii, o sumarycznym IF ponad 18 zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej z wnioskiem (w załączeniu) o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Renaty Smulik-Izydorczyk.

Z poważaniem

Dr hab. n. med. Ewa Słomińska