



UNIWERSYTET OPOLSKI

Instytut Chemii

ROZPRAWA DOKTORSKA

Mgr Damian Tarasek

Utlenianie wybranych leków i związków naturalnych w reakcjach katalizowanych przez peroksydazę chrzanową

Oxidation of selected drugs and natural compounds in reactions catalysed by horseradish peroxidase

Praca napisana pod kierunkiem

Promotor

Dr hab. Hubert Wojtasek, prof. UO

Promotor pomocniczy

Dr Beata Gąsowska-Bajger

Opole 2023

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania Panu dr hab. Hubertowi Wojtasek, prof. UO za pomoc w wyborze tematyki badawczej oraz wsparcie merytoryczne w prowadzonych badaniach. Szczególnie chcę podziękować za nieocenioną pomoc w trakcie pisania rozprawy doktorskiej, cenne uwagi i wskazówki, które przyczyniły się do powstania niniejszej rozprawy.

Chciałbym również podziękować Pani dr Beacie Gąsowskiej-Bajger za pomoc przy dopracowaniu stosowanych metod badawczych oraz prowadzonych badaniach.

Chciałbym także podziękować Pani dr inż. Bożenie Frąckowiak-Wojtasek za pomoc w syntezie i udostępnienie już zsyntezowanych związków.

Wyrazy wdzięczności składam również wszystkim pracownikom Instytutu Chemii Uniwersytetu Opolskiego za miłą atmosferę i życzliwość w trakcie mojej przygody naukowej.

Szczególne podziękowania kieruję Rodzinie i Przyjaciołom za słowa otuchy oraz okazane wsparcie. W szczególności dziękuję dr Adamowi Drop za inspirację do podjęcia się tego wyzwania oraz mojej Żonie za okazaną wyrozumiałość i motywację w chwilach zwątpienia.

Spis treści

1. Wstęp	3
1.1. Peroksydazy	3
1.2. Peroksydaza chrzanowa	4
1.2.1. Ogólna charakterystyka enzymu	5
1.2.2. Struktura peroksydazy chrzanowej	6
1.2.3. Mechanizm katalityczny	10
1.2.4. Naturalne substraty peroksydazy chrzanowej i reakcje ich utleniania	12
1.2.5. Modelowe substraty peroksydazy chrzanowej i reakcje ich utleniania	13
1.2.6. Praktyczne zastosowania peroksydazy chrzanowej	15
1.2.7. Zastosowanie peroksydazy chrzanowej w enzymatycznych testach diagnostycznych	17
1.3. Zakłócenia enzymatycznych testów diagnostycznych wykorzystujących peroksydazę chrzanową	18
1.3.1. Związki naturalne zakłócające enzymatyczne testy diagnostyczne	19
1.3.2. Leki zakłócające enzymatyczne testy diagnostyczne	22
1.3.3. Zagrożenia dla pacjentów spowodowane zakłóceniami w testach diagnostycznych	23
2. Cel pracy	25
3. Materiały i metody	28
3.1. Materiały	28
3.2. Sprzęt	28
3.3. Metody ogólne	29
3.3.1. Pomiary spektrofotometryczne	29
3.3.3. Pomiary zużycia nadtlenu wodoru metodą utlenienia żelaza(II) w obecności oranżu ksylenowego (metoda FOX)	29
3.4. Reakcje z prostymi <i>p</i> -difenolami	30
3.4.1. Reakcje utlenienia <i>p</i> -difenoli przez peroksydazę chrzanową	30
3.4.2. Wpływ <i>p</i> -difenoli na reakcje Trindera	30
3.4.3. Otrzymywanie produktu utlenienia kwasu homogentyzynowego (kwasu cykloheksa-2,5-dieno-1,4-dionooctowego, kwasu <i>p</i> -benzochinonooctowego, BQA)	31
3.5. Reakcje z mesalazyną, ryfampicyną, mitoksantronem i doksorubicyną	31
3.5.1. Reakcje utlenienia mesalazyny, ryfampicyny, mitoksantronu i doksorubicyny przez peroksydazę chrzanową	31
3.5.2. Wpływ mesalazyny, ryfampicyny, mitoksantronu i doksorubicyny na reakcje Trindera	32

3.6. Reakcje z dopaminą, dobutaminą i jej metylovaną pochodną	32
3.6.1. Reakcje utlenienia dopaminy, dobutaminy i jej metylowanej pochodnej przez peroksydazę chrzanową.....	33
3.6.2. Wyznaczenie molowych współczynników absorpcji	33
3.6.3. Wyznaczenie parametrów kinetycznych utlenienia dopaminy, dobutaminy i jej metylowanego analogu przez peroksydazę chrzanową.....	34
3.6.4. Wpływ dopaminy, dobutaminy i jej metylowanej pochodnej na reakcje Trindera	34
3.6.5. Synteza metylowanego analogu dobutaminy (4-(2-{[4-(4-metoksyfenilo)-butan-2-yl]amino}etylo)benzeno-1,2-diolu)	32
3.6.6. Dokowanie molekularne dopaminy, dobutaminy i jej metylowanego analogu do centrum aktywnego peroksydazy chrzanowej.....	35
3.7. Reakcje z kwasem galusowym, kwasem kawowym i hispidyną	35
3.7.1. Reakcje utlenienia kwasu galusowego, kwasu kawowego i hispidyny przez peroksydazę chrzanową.....	35
3.7.2. Wpływ kwasu galusowego, kwasu kawowego i hispidyny na reakcję utlenienia 4-aminoanypiryny i 3,5-dichloro-2-hydroksybenzenosulfonianu sodu przez peroksydazę chrzanową.....	36
3.7.3. Utlenienie kwasu galusowego, kwasu kawowego i hispidyny z 4-aminoanypiryną lub 3,5-dichloro-2-hydroksybenzenosulfonianem sodu	36
3.8. Reakcje z metimazolem i jego analogami selenowymi	37
3.8.1. Reakcje z kationorodnikiem ABTS wygenerowanym chemicznie	37
3.8.2. Pomiary NMR reakcji utlenienia mieszanin ABTS i 1,2-bis(1-metylo-1 <i>H</i> -imidazol-2-yl)diselenid przez peroksydazę chrzanową	37
4. Wyniki.....	39
4.1. Reakcje z prostymi <i>p</i> -difenolami	39
4.2. Reakcje z mesalazyną, ryfampicyną, mitoksantronem i doksorubicyną.....	49
4.3. Utlenianie dopaminy, dobutaminy i jej metylowanego analogu przez peroksydazę chrzanową	57
4.4. Reakcje z kwasem galusowym, kwasem kawowym i hispidyną	66
4.5. Reakcje z metimazolem i jego analogami selenowymi	75
5. Podsumowanie	80
Spis rysunków i tabel.....	83
Bibliografia	86
Streszczenie.....	100
Abstract.....	102
Dodatek.....	104

1. Wstęp

1.1. Peroksydazy

Peroksydazy to ważna grupa enzymów, które katalizują reakcje utlenienia wykorzystując nadtlenki jako akceptory elektronów. Należą one do klasy oksydoreduktaz i tworzą dwie rodziny: peroksydazy hemowe oraz peroksydazy nie zawierające hemu [1]. Hem jest niezbędny do funkcjonowania peroksydaz hemowych, ponieważ umożliwia transport elektronów pomiędzy substratami. Z kolei peroksydazy bezhemowe wykorzystują inne układy, które umożliwiają im transport elektronów, takie jak grupa tiolowa cysteiny (peroksydaza NADH) lub grupa selenolowa selenocysteiny (peroksydaza glutationowa). Peroksydazy hemowe dzielone są na dwie podrodziny - peroksydaz-cyklooksygenaz (peroksydazy zwierzęce) i peroksydaz-katalaz. Te ostatnie składają się z trzech klas: klasa I zawiera peroksydazy prokariotyczne, klasa II zawiera peroksydazy grzybów, a klasa III zawiera peroksydazy roślinne [2]. Peroksydazy zwierzęce składają się z 576-738 aminokwasów i hemu związanego kowalencyjnie, natomiast peroksydazy-katalazy klas I i III składają się z około 300 aminokwasów i hemu związanego oddziaływaniami niekowalencyjnymi [2].

Funkcja tych enzymów zależy w znacznym stopniu od organizmu i ich lokalizacji. Odgrywają one ważną rolę w regulacji stężenia nadtlenczków w komórkach (np. peroksydaza glutationowa) [3]. Pozwala to na utrzymanie równowagi redoks w organizmie, a także zapewnia ochronę przed stresem oksydacyjnym. Peroksydazy zwierzęce uczestniczą między innymi w degradacji ksenobiotyków [2] czy syntezie hormonów [4]. Natomiast peroksydazy roślinne katalizują powstawanie rodników fenoksylowych, które ulegają reakcji sprzęgania tworząc ostatecznie ligniny budujące ściany komórkowe [5]. Enzymy te uczestniczą też w odpowiedzi roślin na infekcje.

Najważniejszymi przedstawicielami peroksydaz zwierzęcych są mieloperoksydaza (MPO), peroksydaza eozynofili (EPO), laktoperoksydaza (LPO) i peroksydaza tarczycowa (TPO). MPO i EPO wydzielane są do wakuol fagocytów i plazmy, natomiast LPO wydzielana jest do mleka, śliny i łez [2]. Enzymy te różnią się od peroksydaz-katalaz tym, że są zdolne do utleniania chlorków (MPO), bromków (MPO, EPO, LPO) i rodanków (utleniane jedynie przez związek I) tworzących silne utleniacze mogące niszczyć szkodliwe mikroorganizmy [2]. Niestety, również komórki gospodarza mogą zostać uszkodzone w przypadku nadaktywności tych enzymów. Szczególnie nadmiernej aktywności MPO przypisuje się udział w wywoływaniu wielu schorzeń, głównie arteriosklerozy [6]. Stąd w ostatnich kilkunastu latach intensywnie poszukiwano inhibitorów tego enzymu [7,8]. EPO jest białkiem o ładunku

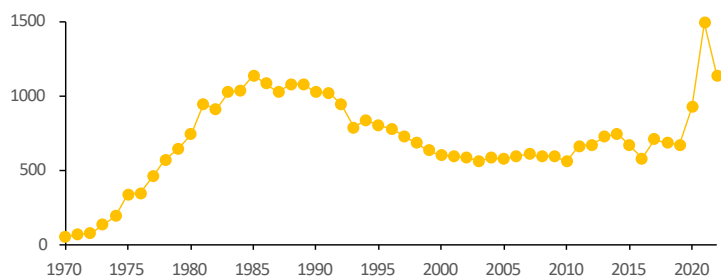
dotatnim, co pozwala mu na wiązanie jonowe z błoną komórkową, dzięki czemu powstające rodniki znajdują się blisko powierzchni komórki mogąc ją zdestabilizować [9]. TPO katalizuje reakcję utleniania jodków, której produkty jodują tyrozynę tyreoglobulin do diiodotyrozyny, a także reakcję utlenienia diiodotyrozyny tyreoglobulin do rodników fenoksylowych, które ulegają reakcji sprzęgania tworząc tyroksynę tyreoglobulin [10]. Z różnych powodów może dojść do nadmiernej syntezy tych związków, co prowadzi do tak zwanej nadczynności tarczycy, niosącej za sobą poważne skutki zdrowotne. Najważniejszą strategią ograniczenia tego zjawiska jest stosowanie inhibitorów TPO [11]. Najpowszechniej od wielu lat stosowane są tiouracyl, 6-*n*-propylotiouracyl i metimazol [11]. TPO, w przeciwieństwie do pozostałych peroksydaz zwierzęcych, które są rozpuszczalne w wodzie, jest białkiem błonowym [2].

Peroksydazy grzybowe są grupą stosunkowo słabo poznaną w porównaniu z peroksydazami zwierzęcymi czy roślinnymi. Jedną z ciekawszych właściwości jest ich udział w procesie rozkładu lignin przez grzyby strzępkowe [12]. Peroksydazy ligninowe mają potencjał zastosowania w biorafineriach. Dotychczas najszerzej przebadaną peroksydazą z tej grupy jest enzym z korownicy śnieżnej (*Phanerochaete chrysosporium*) ale charakteryzowane są peroksydazy tego typu także z innych gatunków [12]. Dotychczas scharakteryzowane peroksydazy ligninowe nie są najlepszymi enzymami do zastosowań przemysłowych.

Niewiele uwagi poświęcono do tej pory także peroksydazom bakteryjnym. Podobnie jak peroksydazy grzybów są one zdolne do degradacji lignin, ale także barwników azowych [13]. Charakteryzują się one szerszymi zakresami aktywności (temperaturowymi i pH), zwłaszcza enzymy z rodziny *Bacillus* [13]. Ze względu na znacznie łatwiejsze modyfikacje genetyczne możliwe jest uzyskanie nowych wariantów tych enzymów o lepszych właściwościach i ich produkcję w dużych ilościach metodami biotechnologicznymi [13,14].

1.2. Peroksydaza chrzanowa

Dotychczas zidentyfikowano i scharakteryzowano peroksydazy z wielu gatunków roślin, m. in. ryżu, jęczmienia i tytoniu. Wykazują one duże podobieństwo między sobą, a największą zgodność w sekwencji aminokwasowej stwierdzono u peroksydaz z bawełny i soi [15]. Pomimo szerokiego występowania peroksydaz u roślin największym zainteresowaniem cieszy się enzym z jednego gatunku – chrzanu pospolitego (*Armoracia rusticana*). Przełożyło się to na ponad 37 tysięcy publikacji poświęconych temu enzymowi. Na Rysunku 1 przedstawiono liczbę takich artykułów opublikowanych w latach 1970-2022.

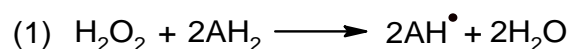


Rysunek 1. Liczba artykułów opisujących badania z użyciem peroksydazy chrzanowej w latach 1970-2022. Na podstawie danych z bazy Scopus.

1.2.1. Ogólna charakterystyka enzymu

Peroksydaza chrzanowa (horseradish peroxidase, HRP) [EC 1.11.1.7.] występuje w postaci wielu izoenzymów. Zostały one podzielone ze względu na wartość ich punktów izoelektrycznych (pI), które dla grupy A mieszczą się w zakresie kwaśnym, dla grup B i C w zakresie bliskim obojętnemu, a dla grup D i E w zakresie zasadowym. Wyniki ogniskowania izoelektrycznego wskazują na istnienie nawet 42 izoenzymów [16]. Dotychczas scharakteryzowano sześć izoenzymów zasadowych (E1-E6), których wartości pI są większe niż 10,6 [17], oraz pięć izoenzymów obojętnych (B1-B3, C1 i C2) o wartości pI między 5 a 10 [18]. Pomimo tak dużej liczby wariantów, jedynie izoenzymy z grupy C są komercyjnie dostępne. Spowodowane jest to łatwością ich izolacji, którą prowadzi się jednoetapowo za pomocą chromatografii powinowactwa wykorzystującej nośnik zawierający *N*-hydroksybenzamid [19].

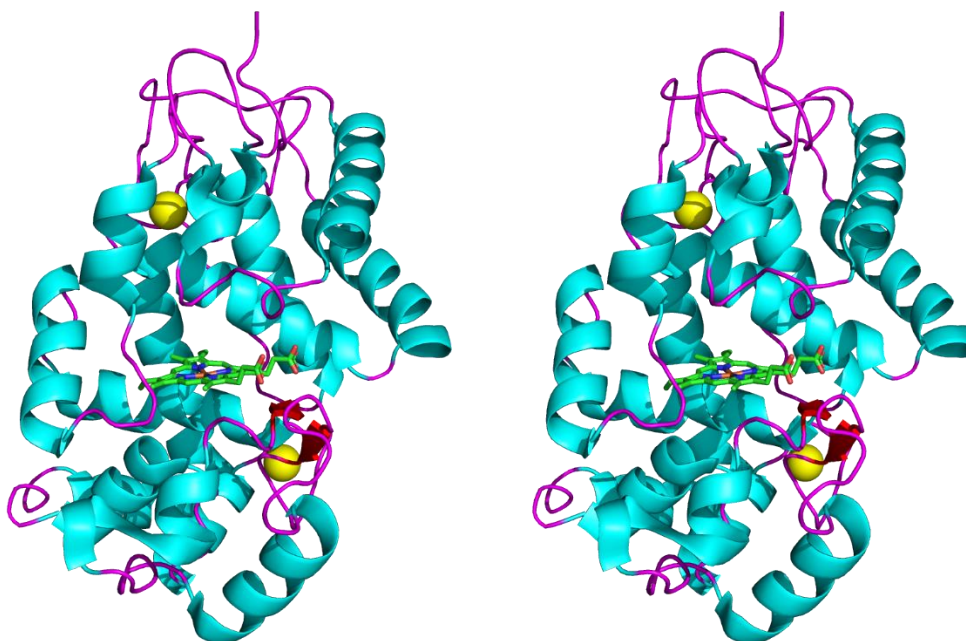
Chociaż do tej pory nie została poznana dokładna rola biologiczna tego enzymu, przypuszcza się, że uczestniczy on w rozkładzie nadtlenu wodoru do wody lub utlenieniu związków organicznych do wolnych rodników zgodnie z równaniem (1). HRP jest zdolna do



utleniającego sprzężania związków fenolowych, takich jak alkohole *p*-kumarowy [20], koniferylowy [21] czy synapinowy [22], które są substratami w biosyntezie lignin [23]. Ponadto wykazano, że HPR potrafi rozkładać kwas indoliloctowy, hormon roślinny, bez obecności nadtlenu wodoru [24].

1.2.2. Struktura peroksydazy chrzanowej

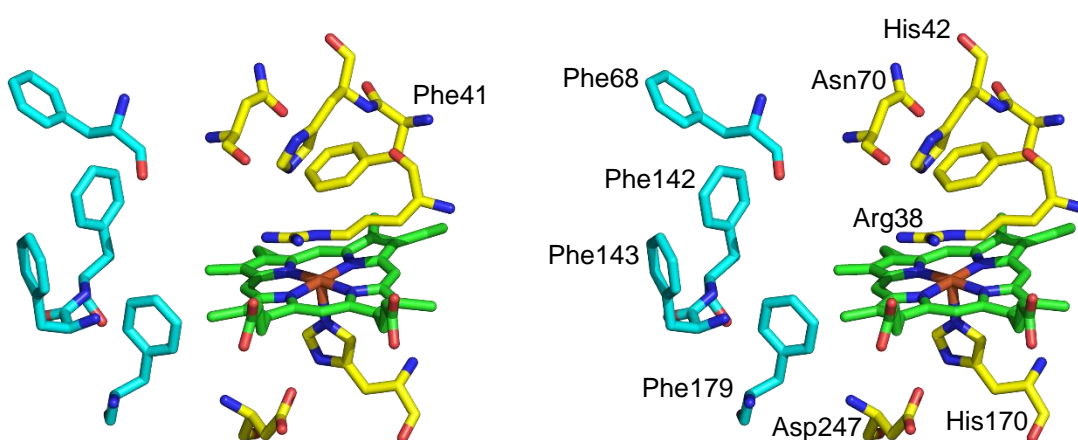
Spośród izoenzymów peroksydazy chrzanowej najszerzej opisany jest wariant C1A, który zostanie dokładniej scharakteryzowany w tym podrozdziale. Jest to białko globularne zbudowane z 308 aminokwasów [25], występuje w formie glikozylowanej [26] o strukturze głównie α -helikalnej, z kilkoma fragmentami o strukturze β -zgięcia [27]. Struktura krystaliczna tego enzymu przedstawiona została na Rysunku 2. Można ją podzielić na dwa fragmenty: dystalny i proksymalny, które są przedzielone kofaktorem, którym jest hem. Jest on połączony z białkiem wiązaniem koordynacyjnym pomiędzy żelazem hemowym a pierścieniem imidazolowym His170. Struktura białka stabilizowana jest przez cztery mostki disiarczkowe utworzone między resztami Cys11-Cys91, Cys44-Cys49, Cys97-Cys301 i Cys177-Cys209, a także mostkiem solnym pomiędzy Asp99 i Arg125 [25]. W swej strukturze enzym zamiera dwa kationy wapnia, koordynowane przez siedem aminokwasów za pośrednictwem atomów tlenu, których obecność jest konieczna do prawidłowego funkcjonowania enzymu [28].



Rysunek 2. Struktura krystaliczna izoenzymu C1A peroksydazy chrzanowej [PDB: 1H5A] [29]. Grupa hemowa zaznaczona na zielono, jony wapnia zaznaczone na żółto, α -helisy zaznaczone na niebiesko, β -zgięcia na czerwono a fragmenty nieustrukturyzowane zaznaczone magentą. Obraz stereoskopowy przedstawiony techniką krzyżogłądu.

Region dystalny zawiera aminokwasy biorące udział w procesie katalitycznym - Arg38 i His42 (biorące udział w tworzeniu związku I). Ponadto region ten zawiera jeden z kationów wapnia stabilizujących jego strukturę. Region proksymalny zamiera His170, która, jak już wspomniano, tworzy wiązanie koordynacyjne z jonem żelaza hemu. Region ten zawiera drugi z kationów wapnia, również stabilizujący jego strukturę.

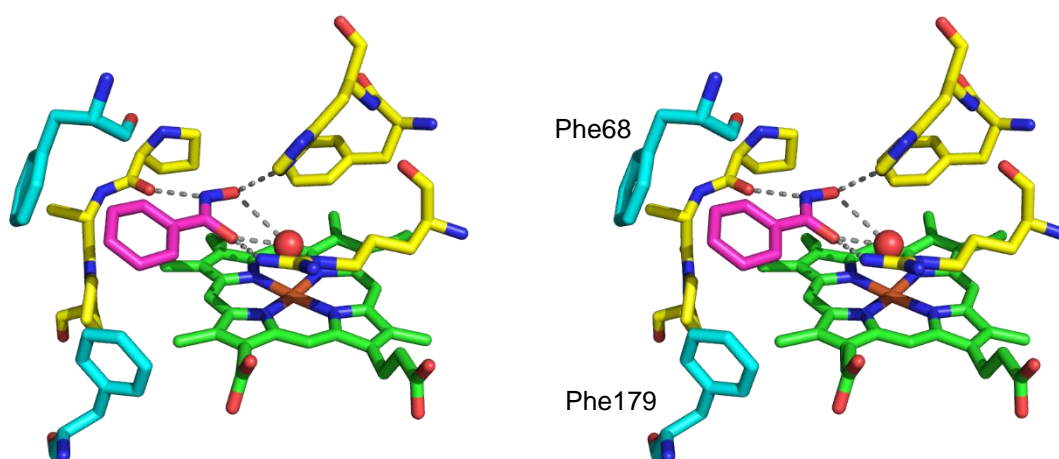
Centrum katalityczne, poza hemem, tworzą Asp247, His170, Arg38, Asn70, His42 i Phe41, co przedstawiono na Rysunku 3. Wejście do centrum aktywnego jest otoczone czterema resztami fenyloalanin Phe68, Phe142, Phe143 i Phe179.



Rysunek 3. Centrum katalityczne peroksydazy chrzanowej [PDB: 1HCH] [29]. Grupa hemowa zaznaczona na zielono, reszty aminokwasów centrum aktywnego zaznaczone na żółto, reszty fenyloalanin otaczających wejście do centrum aktywnego zaznaczono kolorem cyjan. Obraz stereoskopowy przedstawiony techniką krzyżogłądu.

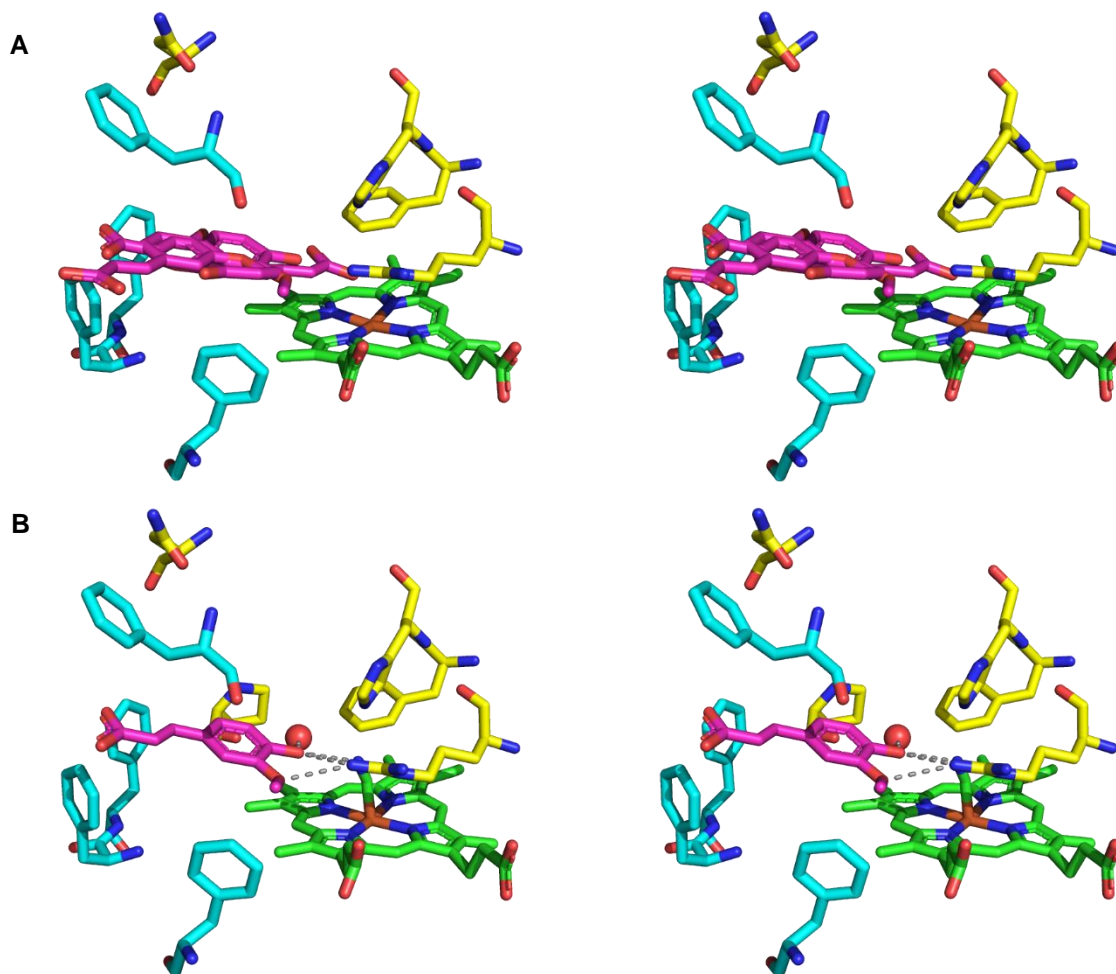
W czasie wiązania substratu nie obserwuje się zbyt drastycznych zmian konformacyjnych. Wartości RMSD (root mean square deviation, odchylenie średniokwadratowe) dla struktur krystalicznych HRPC [PDB: 1ATJ] i kompleksu HRPC–kwas benzhydroksamowy (BHA) [PDB: 2ATJ] wynoszą odpowiednio 0,3 Å dla atomów łańcucha głównego oraz 1,0 Å dla atomów łańcuchów bocznych [30]. Pośród aminokwasów reszta Phe68 zmienia swoje położenie w czasie wiązania BHA, ustawiając pierścień fenyłowy prawie prostopadle do pierścienia aromatycznego tego liganda. Można to zauważyć porównując Rysunki 3 i 4. BHA tworzy wiązania wodorowe z His42, Arg38, Pro139 oraz cząsteczką wody. Ponadto oddziałuje hydrofobowo z Phe68, Gly69, Ala140, Pro140, Phe179, a także z hemem. BHA jednakże różni się od typowych substratów HRP, posiadając więcej

możliwości oddziaływań hydrofilowych. Wiązanie typowych substratów opiera się bowiem przede wszystkim na oddziaływaniach hydrofobowych. Przypuszcza się, że bardziej zewnętrzne części miejsca wiązania fragmentów aromatycznych substratów są bardziej podatne na zmiany konformacyjne, na przykład Phe68, co byłoby konieczne w momencie wiązania cząsteczek bardziej rozbudowanych niż BHA [30]. Funkcją tej przestrzeni jest przytrzymanie substratu dostatecznie blisko, aby mogło zajść przekazanie elektronu, a jednocześnie odpowiednio daleko, aby nie mogło dojść do reakcji z żelazem hemowym.



Rysunek 4. Wiązanie kwasu benzhydroksamowego w centrum aktywnym HRP [PDB: 2ATJ] [30]. Grupa hemowa zaznaczona na zielono, reszty aminokwasów centrum aktywnego zaznaczone na żółto, reszty fenyloalaninu wejścia do centrum aktywnego zaznaczone kolorem cyjan, a kwas benzhydroksamowy zaznaczony magentą. Czerwona kula przedstawia położenie cząsteczki wody. Szare przerywane linie przedstawiają oddziaływania wodorowe. Obraz stereoskopykowy przedstawiony techniką krzyżogłądu.

Dużo bardziej typowym substratem HRP jest kwas ferulowy (FA), którego kompleksy z enzymem [PDB: 6ATJ] oraz z enzymem wiążącym cyjanek [PDB: 7ATJ] udało się wykrystalizować [31]. Produktem utlenienia tego związku jest kwas diferulowy, dlatego uzyskanie struktury krystalicznej ze związkiem I lub II jest niewykonalne. Podobnie jak w przypadku kompleksu HRPC-BHA, kompleksy HRPC-FA i HRPC-CN-FA nie odbiegają szczególnie od struktury samego enzymu. Największe zmiany konformacyjne dotyczą reszt Phe68, Asn135, Phe142, Phe143 i Phe179. Reszty fenyloalaninu oddziałują z bardziej oddaloną od centrum katalicznego częścią cząsteczki substratu. Reszta Phe68 w obu przypadkach nie zamyka dostępu do centrum katalicznego, jak to ma miejsce w kompleksie z BHA, ale jest bliższa położenia w konformacji enzymu nie wiążącego substratu. Wiązanie kwasu ferulowego przedstawione jest na Rysunku 5. Zaobserwowano trzy równocenne pozycje FA, przy czym



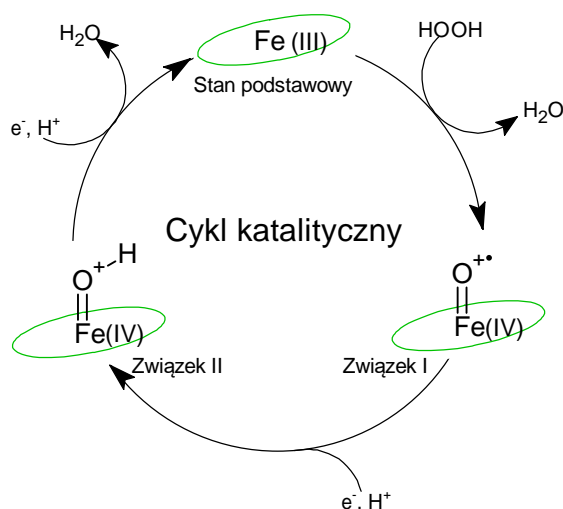
Rysunek 5. Wiązanie kwasu ferulowego w centrum aktywnym peroksydazy chrzanowej (A) [PDB: 6ATJ] oraz w centrum aktywnym enzymu ze związanym cyjankiem (B) [PDB: 7ATJ] [31]. Grupa hemowa zaznaczona na zielono, reszty aminokwasów centrum aktywnego zaznaczone na żółto, reszty fenyloalanin wejścia do centrum aktywnego zaznaczone kolorem cyjan, a kwas ferulowy zaznaczony magentą. Czerwona kula przedstawia położenie cząsteczki wody. Obraz stereoskopowy przedstawiony techniką krzyżogłądu.

w jednej z nich grupa karboksylowa pokrywałaby się z tlenem związanym z żelazem hemowym związku I i II. Przypuszcza się, że ta właśnie pozycja mogłaby odpowiadać za inhibicję substratową *in vitro* poprzez spowolnienie reakcji enzymu z nadtlaniem wodoru [31]. Obecność cyjanku uniemożliwia wystąpienie pozycji FA skierowanego grupą karboksylową do centrum katalitycznego, więc obserwuje się tylko dwie równocenne pozycje FA. Atomy tlenu grup fenolowej i metoksylovej tworzą wiązania wodorowe z resztą Arg38. Dodatkowo grupa fenolowa tworzy wiązanie wodorowe z cząsteczką wody związaną z resztą Pro139. Ligand ten tworzy jeszcze oddziaływania hydrofobowe z resztami Phe68, Gly69, Pro139, Ala140, Phe142, Phe179 i hemem. Porównanie kompleksów HRPC z BHA, FA i CN-FA pozwala na zasugerowanie roli Arg38 w stabilizacji stanu przejściowego przy

tworzeniu się związku I, poprzez tworzenie wiązania wodorowego z tlenem nadtlenu związanego z żelazem [31]. Wiązanie się FA do centrum katalitycznego osłabia wiązanie wodorowe pomiędzy resztą Arg38 a tlenem żelaza hemowego, działając jako aktywator żelaza [31]. Podsumowując, w tym kompleksie przestrzeń wiążąca układy aromatyczne w HRP pozostaje otwarta, co pozwala na szybką wymianę takich małych substratów aromatycznych oraz wymianę rozpuszczalnika.

1.2.3. Mechanizm katalityczny

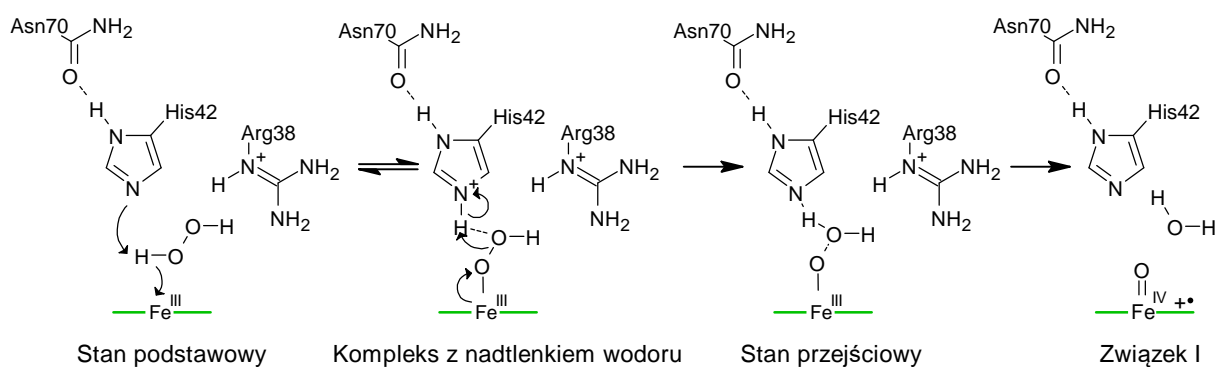
Peroksydaza chrzanowa może występować w pięciu stanach, które obejmują: stan podstawowy, związek I, związek II, związek III i stan żelaza(II). Enzym ten jest w stanie katalizować reakcje w dwóch cyklach: oksydacyjnym i peroksydacyjnym. W cyklu oksydacyjnym tlen jest wykorzystywany jako akceptor elektronów i biorą w nim udział: stan podstawowy, stan żelaza(II) i związek III [29]. W cyklu peroksydacyjnym, który uznawany jest za podstawowy dla tego enzymu, akceptorem elektronów jest nadtlenek wodoru. W tym cyklu biorą udział stan podstawowy, związek I i związek II [32,33]. Został on przedstawiony na rysunku 6.



Rysunek 6. Mechanizm katalityczny peroksydazy chrzanowej w cyklu peroksydacyjnym [32,33].

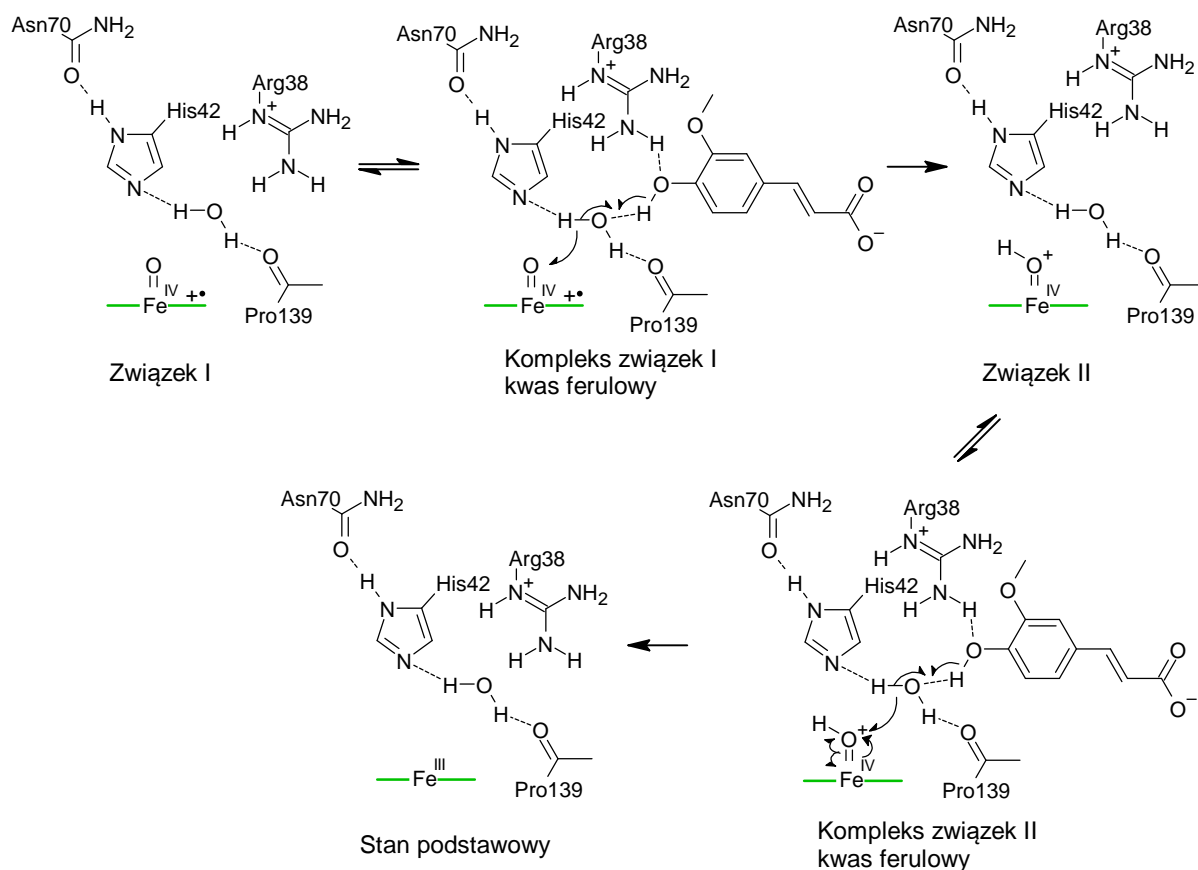
Wszystkie pięć stanów zostało scharakteryzowanych za pomocą rentgenografii strukturalnej [29]. Stan podstawowy zawiera pięcio-koordynacyjny jon żelaza, natomiast związek I, który powstaje przez przyłączenie jednego z atomów tlenu nadtlenu wodoru i oddanie jednego elektronu z żelaza oraz jednego elektronu z pierścienia porfirynowego, co daje π -kationorodnik, zawierający sześć-koordynacyjny jon żelaza. Atom tlenu związany

z żelazem tworzy wiązania wodorowe z Arg38 i cząsteczką wody, najprawdopodobniej powstałej w wyniku redukcji drugiego atomu tlenu nadtlenu wodoru, która dodatkowo tworzy wiązania wodorowe z His42 i Arg38. His42 przyjmuje proton od nadtlenu wodoru, a Arg38 stabilizuje stan pośredni, co przedstawiono na rysunku 7 [34]. Związek II powstaje po przyjęciu jednego elektronu od substratu redukującego przez pierścień porfirynowy, który przestaje być rodnikiem, i również zawiera sześć-koordynacyjny jon żelaza. Atom tlenu związany z żelazem tworzy wiązanie wodorowe z Arg38 i cząsteczką wody, a dodatkowo wiąże proton, prawdopodobnie przekazany z His42 za pośrednictwem cząsteczki wody. Stan podstawowy powstaje po przyjęciu drugiego elektronu przez jon żelaza z drugiej cząsteczki substratu redukującego. Kwas ferulowy, który jest jednym z typowych substratów HRP, jest utleniany przez ten enzym do rodnika fenoksyłowego. Mechanizm tych reakcji z udziałem FA przedstawiony jest na Rysunku 8.



Rysunek 7. Rola His42 i Arg38 w tworzeniu związku I [34].

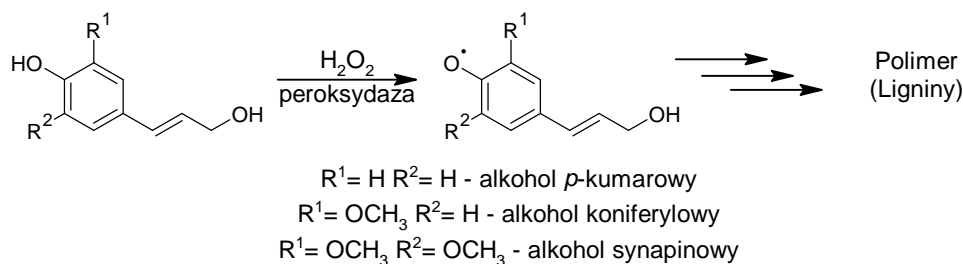
Pierwsza cząsteczka FA reaguje ze związkiem I oddając proton z grupy fenolowej na cząsteczkę wody, która przekazuje go reszcie His42 a elektron przekazuje kationorodnikowi hemowemu. Warto zwrócić uwagę, że cząsteczka wody biorąca udział w reakcji jest konserwatywna w strukturach krystalicznych i tworzy wiązanie wodorowe z Pro139. Druga cząsteczka FA reaguje ze związkiem II, podobnie jak poprzednio przekazując proton z grupy fenolowej cząsteczce wody, która tym razem oddaje go atomowi tlenu związanemu z żelazem hemowym. Przyjmuje on również proton od His42 i po przyjęciu elektronu z FA przez żelazo hemowe, odłącza się od hemu w postaci cząsteczki wody. Powstaje drugi rodnik fenoksyłowy, a enzym powraca do stanu podstawowego [34].



Rysunek 8. Mechanizm reakcji utlenienia kwasu ferulowego przez peroksydazę chrzanową [34].

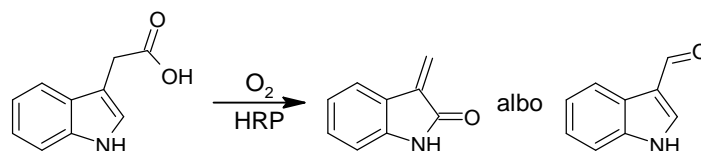
1.2.4. Naturalne substraty peroksydazy chrzanowej i reakcje ich utleniania

Znanych jest wiele substratów HRP występujących w naturze, np. kwas ferulowy [31] alkohole *p*-kumarowy [20], koniferylowy [21] czy synapinowy [22], ale jak wspomniano w podrozdziale 1.1, nie ma pewności czy w ramach fizjologii chrzanu pospolitego te związki są rzeczywiście substratami peroksydazy chrzanowej. Utlenienie pochodnych alkoholu *p*-kumarowego przedstawione zostało na Rysunku 9.



Rysunek 9. Reakcje utlenienia pochodnych alkoholu *p*-kumarowego przez peroksydazę chrzanową [20].

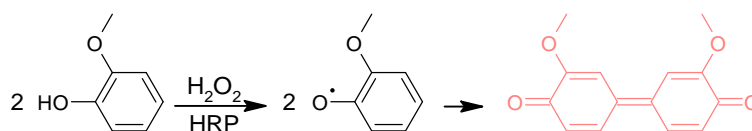
Interesującą własnością peroksydazy chrzanowej jest jej zdolność do utlenienia kwasu indoliloctowego przy nieobecności nadtlenu wodoru w pH 5,0. Reakcja ta przedstawiona jest na Rysunku 10. W reakcji tej udział bierze tlen [24]. Związek ten jest również utleniany w obecności nadtlenu wodoru do rodnika, co już odbywa się w obojętnym pH [35].



Rysunek 10. Reakcja utlenienia kwasu indoliloctowego przez peroksydazę chrzanową w cyklu oksydacyjnym [24,35].

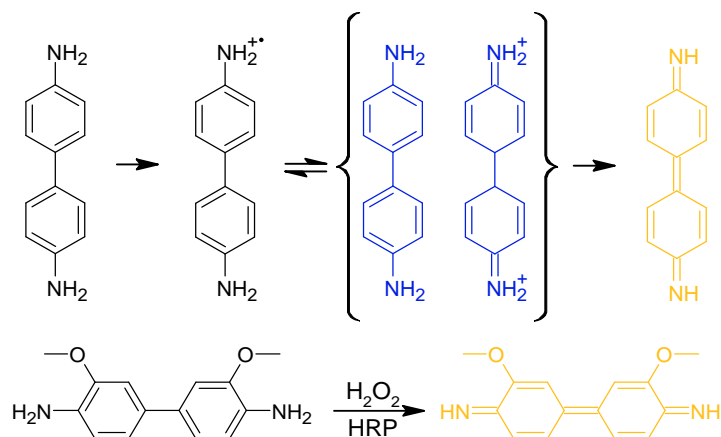
1.2.5. Modelowe substraty peroksydazy chrzanowej i reakcje ich utleniania

Gwajakol jest uniwersalnym substratem peroksydaz, dlatego jest szeroko stosowany w badaniach tej grupy enzymów. Produktem utlenienia jest rodnik fenoksylowy, który sprzęga się z kolejnym rodnikiem gwajakolu dając łososiowy produkt końcowy (maksimum absorpcji 470 nm). Reakcja ta przedstawiona jest na Rysunku 11. Możliwe jest również powstanie cząsteczek będących produktami sprzęgania więcej niż dwóch rodników [36]. Utlenienie gwajakolu jest reakcją najczęściej stosowaną do wyznaczenia aktywności peroksydaz [37], szczególnie peroksydazy chrzanowej.



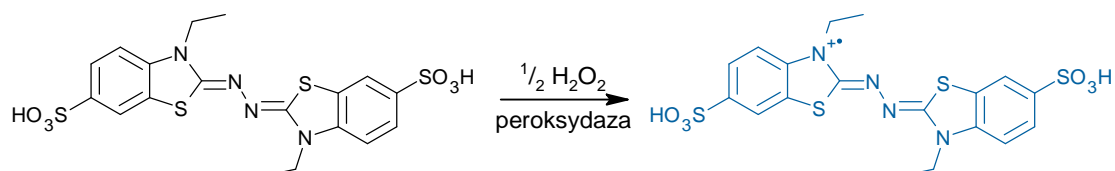
Rysunek 11. Reakcja utlenienia gwajakolu przez peroksydazę chrzanową [36].

Kolejnym modelowym substratem dla peroksydaz jest benzydyna i jej pochodne np. *o*-dianizydyna [38]. Pochodne te były nawet stosowane w testach diagnostycznych, jednakże zaprzestano ich stosowania ze względu na ich rakotwórczość [39,40]. Jedna cząsteczka tych substratów jest donorem dwóch elektronów i protonów. Produkt pośredni, kompleks z przeniesieniem ładunku, ma barwę niebieską lub zieloną w przypadku *o*-dianizydyny, a produkt końcowy jest żółtopomarańczowy [41]. Reakcja ta przedstawiona jest na Rysunku 12.



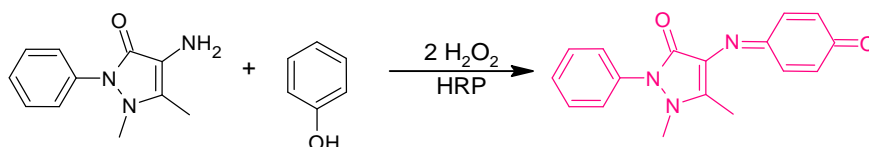
Rysunek 12. Reakcja utlenienia benzydyny oraz *o*-dianizydyny przez peroksydazę chrzanową [38,41].

Modelowym substratem jest również kwas 2,2'-azyno-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy) (ABTS) [42], stosowany przede wszystkim dla reakcji katalizowanych przez LPO. Powstający rodnik ma zielononiebieską barwę (wykazuje maksima absorpcji przy około 415 i 730 nm). Równanie reakcji utlenienia tego substratu przedstawione jest na Rysunku 13. Reakcja ta może również być wykorzystywana do oznaczania stężenia nadtlenu wodoru [43], jednakże częściej używa się do tego celu utlenienia mieszaniny fenolu z 4-aminoantypiryną [44].



Rysunek 13. Reakcja utlenienia ABTS-u katalizowana przez peroksydazy.

Typowymi substratami HRP w układach laboratoryjnych są także różne pochodne fenolu i aniliny [45–48]. Standardowo dla HRP stosowany jest fenol w mieszaninie z 4-aminoantypiryną [49]. Schemat reakcji powstawania barwnego produktu przedstawiony jest na Rysunku 14. Reakcja ta jest również wykorzystywana do oznaczania stężenia nadtlenu wodoru [50].



Rysunek 14. Schemat reakcji utlenienia fenolu z 4-aminoantypiryną katalizowanej przez peroksydazę chrzanową.

1.2.6. Praktyczne zastosowania peroksydazy chrzanowej

Peroksydaza chrzanowa jest jednym z enzymów o najszerszym zakresie zastosowań praktycznych, obejmujących między innymi: testy immunologiczne, Western blotting, biosensory, testy diagnostyczne, oczyszczanie ścieków, przemysł papierniczy i reakcje biotechnologiczne [51–54].

Wykrywanie białek czy kwasów nukleinowych za pomocą testów immunoenzymatycznych (ELISA) lub Western blottingu ma ogromne znaczenie zarówno diagnostyczne jak i badawcze. W obu tych przypadkach konieczna jest wizualizacja powstającego kompleksu antygen-przeciwciała, którą uzyskuje się poprzez przeprowadzenie reakcji chemicznej dającej barwny lub luminescencyjny produkt. Najszerzej stosowanym w tym celu enzymem jest właśnie HRP, którą sprzęga się z przeciwciałami [51]. Pozwala to na prowadzenie badań naukowych, ale też oznaczanie markerów chorobowych.

Sensory pozwalają na szybki i prosty pomiar stężeń analitów, a oznaczanie stężenia nadtlenu wodoru jest potrzebne w procesach przemysłowych oraz w układach biologicznych. Zastosowanie HRP w biosensorach pozwala na oznaczenie nadtlenu wodoru i nadtlenu organicznych [51]. Natomiast bezpośrednie oznaczenie nadtlenu wodoru przy użyciu standardowych elektrod jest problematyczne z powodu wysokiego nadnapięcia (elektroda wymaga więcej energii niż jest potrzebne do przeprowadzenia reakcji), dlatego konieczne są modyfikacje elektrod [55]. Zastosowanie dodatkowych enzymów w takich układach pozwala na oznaczenie przykładowo glukozy albo alkoholi [51].

Związki aromatyczne, takie jak pochodne fenolu i amin aromatycznych, stanowią jedne z głównych zanieczyszczeń ścieków wielu gałęzi przemysłu (między innymi tworzyw sztucznych, barwników, górniczego i papierniczego), które mogą być usuwane za pomocą HRP [51]. Działanie enzymu polega na degradacji lub polimeryzacji rodnikowej tych związków bezpośrednio przez utlenienie enzymatyczne lub pośrednio przez substancje dodawane do mieszaniny, działające jako bezpośrednie substraty peroksydazy, których produkty utlenienia reagują później z usuwanymi związkami [51,54].

Podejmowane były również próby zastosowania HRP w reakcjach sprzęgania, nitrowania i sulfonowania związków aromatycznych [52]. Mogą one stanowić uzupełnienie dla klasycznych metod przeprowadzania takich reakcji, ponieważ można je prowadzić w łagodnych warunkach z dużą specyficnością.

Enzym ten pozwala również na otrzymanie materiałów polimerowych o wyjątkowych właściwościach (obecność grup funkcyjnych niespotykanych w konwencjonalnych polimerach

np. grupa winylowa), dzięki selektywnej polimeryzacji grup fenolowych, przy zachowaniu łagodnych warunków [51,52]. Przykładowo polimeryzacja kwasu kumarowego katalizowana HRP pozostawia nienaruszoną grupę karboksylową, zdolną do dalszej reakcji [52]. Pozwala to na pozyskanie polimeru, który może być następnie modyfikowany, np. sieciowany (jeżeli drugą grupą będzie przykładowo grupa metakrylowa). Niedogodnością w tego typu zastosowaniu jest problematycznie niska rozpuszczalność polimerów w wodzie, co wymusza stosowanie układów micelarnych lub dodatku rozpuszczalników organicznych [52]. Jednak pomimo tych ograniczeń nadal jest to obiecujący kierunek prac nad materiałami polimerowymi.

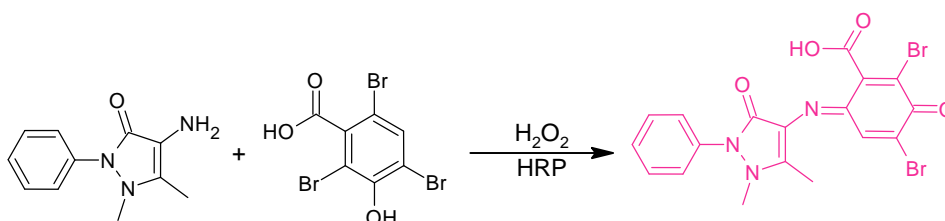
Szczególnym przykładem praktycznego wykorzystania polimerów otrzymywanych lub modyfikowanych za pomocą HRP jest produkcja hydrożeli. Ze względu na dobrą biogodność tego materiału ma on potencjalne zastosowanie w inżynierii tkankowej, nośnikach leków i leczeniu ran [51,56,57]. Przykłady zastosowania hydrożeli otrzymywanych przy użyciu HRP obejmują: środowisko/rusztowanie dla proliferacji i różnicowania się komórek, opatrunki, powłoki hydrożelowe na pojedynczych komórkach wytwarzających nadtlenek wodoru lub zawierające na powierzchni błony komórkowej immobilizowaną HRP [56,57].

Rodnik kwasu indoliloctowego wykazuje działanie cytotoksyczne. Jego wytwarzanie przez HRP ma więc potencjalne zastosowanie przeciwnowotworowe [35,58]. Sam kwas indoliloctowy, czy sama HRP nie działają toksycznie na komórki. Natomiast jeżeli udałoby się zakumulować HRP w sąsiedztwie komórek nowotworowych, czy to poprzez oddziaływanie przeciwciał połączonych z enzymem [35], czy nanocząstek [58] (mających zdolność do kumulowania się w tkankach nowotworowych [59]) uzyskano by terapię o znacznie łagodniejszych skutkach ubocznych, za sprawą działania miejscowego (niemalże wyłącznie na komórki nowotworowe).

Podjęmowane są także próby użycia tego enzymu w innych obszarach. Przykładem może być zastosowanie HRP jako wskaźnika do szybkiego sprawdzenia procesu sterylizacji mleka - ze względu na relatywnie wysoką odporność na temperaturę, enzym traci aktywność dopiero, gdy proces ten zostanie prawidłowo przeprowadzony [54]. Pilotażowo stosuje się HRP również do pozbycia się nieprzyjemnego zapachu obornika świńskiego, pochodzącego głównie od związków fenolowych, które za pomocą HRP i nadtlenu wodoru zostają przekształcone w bezwonne polimery [51,54].

1.2.7. Zastosowanie peroksydazy chrzanowej w enzymatycznych testach diagnostycznych

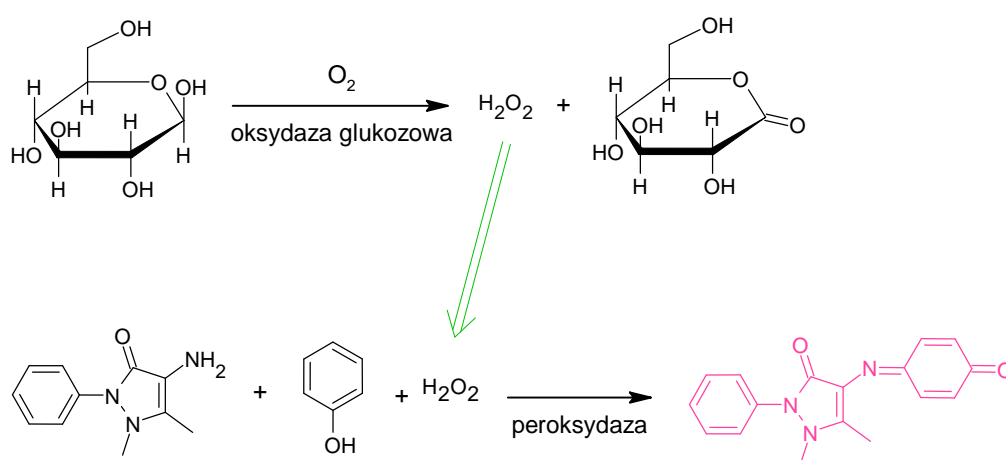
Ze względu na swoją niską cenę i dobrą stabilność HRP jest od dawna stosowana jako podstawowy enzym reporterowy w testach diagnostycznych. Reakcja katalizowana przez ten enzym ma na celu umożliwienie pomiaru za pomocą spektrofotometrii, ponieważ produkt tej reakcji jest barwny. W roku 1969 Paul Trinder zaproponował stosowanie adrenaliny w zastępstwie *o*-tolidyny, która ma właściwości rakotwórcze, w stosowanym już układzie do oznaczania glukozy [40]. Jednakże metoda ta wykazywała się brakiem powtarzalności w wariancie manualnym. Z tego powodu, w tym samym roku Trinder zaproponował użycie 4-aminofenazonu (dziś nazywany 4-aminoantypiryną) i fenolu w celu uzyskania barwnego produktu [60]. Od tego czasu układ ten zaczął zyskiwać coraz szersze zastosowanie w testach diagnostycznych. Wcześniej był on stosowany do oznaczenia zawartości fenolu w wodzie [44]. Układ ten był później modyfikowany poprzez wprowadzenie różnych pochodnych fenolu i aniliny jako substratów HRP. Sam Trinder już w 1972 roku zaproponował użycie sulfonowanego 2,4-difenolu, którego produkt sprzężenia z 4-aminoantypiryną ma znacznie większy współczynnik absorpcji, co pozwala na oznaczenie glukozy z mniejszej ilości próbki [61]. Reakcja ta została później udoskonalona w wariancie do oznaczenia kwasu moczowego [62]. Później zaproponował również użycie kwasu 2,4,6-tribromo-3-hydroksybenzoowego do oznaczania cholesterolu HDL (lipoproteiny o dużej gęstości) [63]. Schemat tej reakcji przedstawiony jest na Rysunku 15. Od tamtego czasu wprowadzono wiele wariantów reakcji Trindera do oznaczenia glukozy, kreatyniny, kwasu moczowego, cholesterolu całkowitego, cholesterolu HDL, cholesterolu LDL, triacylogliceroli i mleczanu [64].



Rysunek 15. Schemat reakcji utlenienia 4-aminoantypiryny i kwasu 2,4,6-tribromo-3-hydroksybenzoowego przez peroksydazę chrzanową [63].

1.3. Zakłócenia enzymatycznych testów diagnostycznych wykorzystujących peroksydazę chrzanową

W testach diagnostycznych wykorzystywanych jest od dwóch do kilku reakcji mających na celu przeniesienie stężenia analitu na stężenie chromoforu. Stężenie chromoforu oznaczone spektrofotometrycznie jest następnie na podstawie krzywej kalibracyjnej przepisywane na stężenie analitu. Konkretnie anality oznaczane są przy zastosowaniu specyficznej oksydazy tworzącej jako produkt uboczny nadtlenek wodoru. Przykładem jest oksydaza glukozowa stosowana w testach do oznaczenia glukozy. Schemat reakcji biorących udział w teście diagnostycznym do oznaczenia glukozy przedstawiony jest na Rysunku 16.

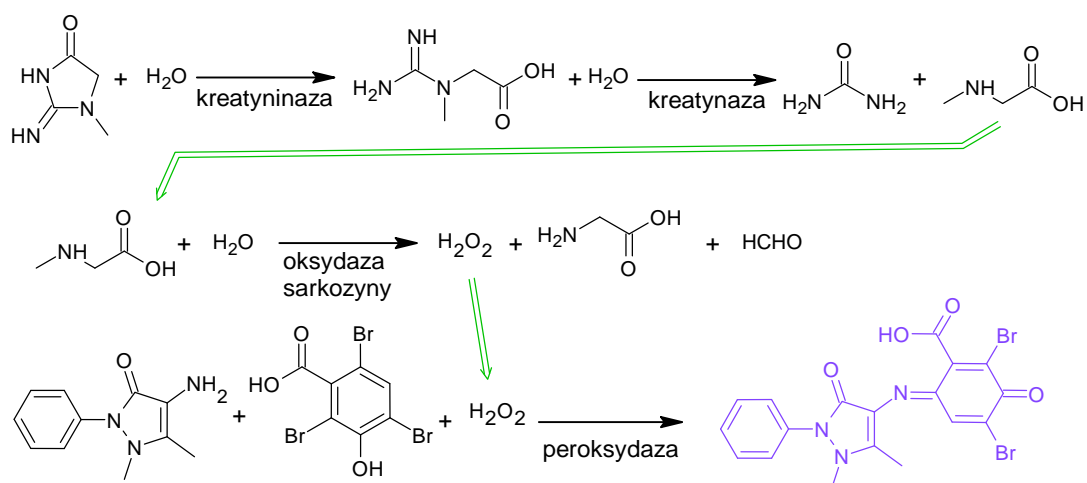


Rysunek 16. Schemat reakcji zachodzących w teście diagnostycznym do oznaczenia glukozy [65].

Układ do oznaczenia glukozy jest przypadkiem najprostszym, składającym się jedynie z oksydazy specyficznej dla analitu, produkującej również nadtlenek wodoru, i peroksydazy katalizującej reakcję wizualizującą. Oznaczenie niektórych analitów, np. kreatyniny, odbywa się na drodze czterech reakcji. Pierwsza z reakcji, będąca specyficzną dla analitu, nie produkuje nadtlenu wodoru, dopiero w rezultacie kolejnych reakcji półproduktów uzyskuje się produkt będący substratem dla oksydazy produkującej nadtlenek wodoru. Schemat reakcji biorących udział w teście diagnostycznym do oznaczenia kreatyniny przedstawiony jest na Rysunku 17.

HRP katalizuje reakcję, której produktem jest rodnik uwalniany do rozpuszczalnika, gdzie dopiero zachodzi reakcja z drugim rodnikiem, dająca barwny produkt. Nie jest jednak jasne czy rodnik aminoantypiryłowy powstaje w wyniku utlenienia enzymatycznego 4-aminoantypiryny, czy też w wyniku utlenienia tego związku przez rodnik fenoksyłowy.

Wynik testu diagnostycznego może zostać zafałszowany na wielu etapach. Jednym z nich jest zahamowanie powstawania barwnego produktu, na podstawie stężenia którego ustalane jest stężenie analitu. Może to być spowodowane inhibicją jednego z enzymów, ale również reakcjami z produktami pośrednimi tej reakcji lub jej produktem końcowym, a nawet bezpośrednią reakcją z nadtlenkiem wodoru.



Rysunek 17. Schemat reakcji zachodzących w teście diagnostycznym do oznaczenia kreatyniny [66].

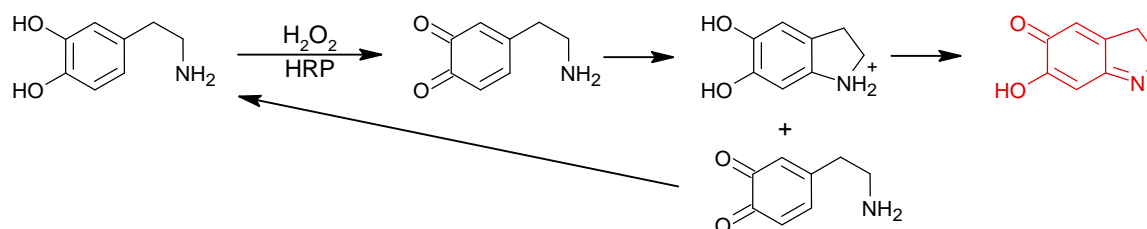
1.3.1. Związki naturalne zakłócające enzymatyczne testy diagnostyczne

W literaturze najlepiej opisany jest wpływ kwasu askorbinowego na wyniki testów diagnostycznych [67–72]. Kwas askorbinowy jest witaminą i przeciwutleniaczem, którego obecność znacznie zaniża wyniki testów diagnostycznych, ale efekt ten zmniejsza się wraz z czasem przechowywania próbki. Jest to związane z utlenieniem tego związku tlenem atmosferycznym. Zaproponowano, że zakłócenia testów diagnostycznych przez kwas askorbinowy są spowodowane jego preferencyjnym utlenieniem przez peroksydazę. Uzasadniono ten mechanizm stechiometrią wpływu tego związku i brakiem zmian przy różnych stężeniach 4-aminoantypiryny czy fenolu [71]. Ten sam mechanizm został później zaproponowany dla wszystkich układów stosujących peroksydazę [70]. Jednakże kwas askorbinowy jest silnym reduktorem [73] zdolnym do szybkiego zredukowania rodnika fenoksylogowego [74], co może hamować powstawanie barwnego produktu.

Bilirubina jest półproduktem w ścieżce degradacji hemu u kręgowców. Jej obecność wpływa na wyniki uzyskiwane w testach wykorzystujących reakcję Trindera [75]. Podwyższony poziom bilirubiny we krwi to hiperbilirubinemia, występująca np. w zespole

Gilberta. Dla bilirubiny zaproponowano między innymi taki sam mechanizm jak dla kwasu askorbinowego [75], ponieważ bilirubina również posiada właściwości redukujące [76]. Ponadto rozpatrywano wpływ bilirubiny poprzez jej własną absorbancję w stosowanym zakresie, redukcję produktów pośrednich reakcji katalizowanej przez oksydazę, redukcję produktów pośrednich reakcji katalizowanej przez peroksydazę lub redukcję końcowego produktu [75]. Za najprawdopodobniejszy mechanizm uznano wpływ absorbancji bilirubiny i redukcję półproduktów reakcji katalizowanej przez peroksydazę [75].

Dopamina jest neuroprzebieżnikiem stosowanym również jako lek. Gdy była podawana przez ten sam cewnik, przez który pobierano krew do badań, zaobserwowano znacznie obniżone wyniki testów diagnostycznych do oznaczenia kreatyniny, triacylogliceroli, cholesterolu i kwasu moczowego [67,77,78]. Zakłócenia te stanowiły też podstawę do opracowania metody ilościowego oznaczenia dopaminy i adrenaliny w lekach [79,80]. Jako przyczynę zakłóceń powodowanych dopaminą zaproponowano jej reakcję z 4-aminoantypiryną i utworzenie nowego chromoforu o mniejszym współczynniku absorpcji niż produkt reakcji Trindera [78]. Dopamina jest jednak substratem peroksydazy chrzanowej i w wyniku utlenienia tworzy dopaminochrom o czerwonym kolorze [81]. Schemat tej reakcji przedstawiony jest na Rysunku 18.



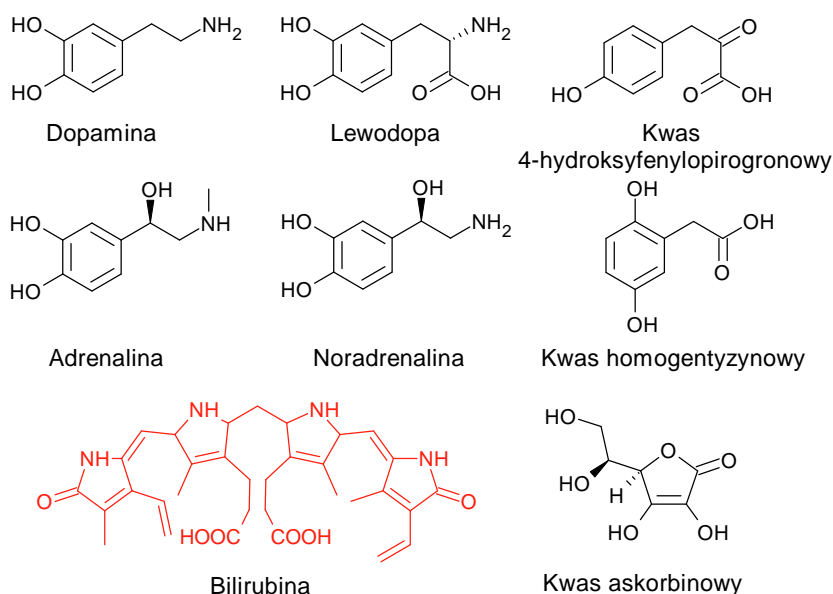
Rysunek 18. Schemat reakcji utlenienia dopaminy przez peroksydazę chrzanową.

Lewodopa jest naturalnym aminokwasem stosowanym również jako lek w leczeniu choroby Parkinsona, który również obniża wyniki testu do wykrywania kwasu moczowego [79,82]. Obserwując powstawanie produktu o maksimach absorpcji przy 310 i 450 nm przypuszczano, że związek ten jest utleniany przez peroksydazę do chinonu, używając nadtlenu wodoru konieczny do powstania chromoforu Trindera [79]. Widma reakcji Trindera w obecności lewodopy wykazują jednak przyrosty absorpcji przy 475 nm (maksimum absorpcji dopachromu) świadczące o powstawaniu jedynie tego chromoforu (co wynika ze współczynnika absorpcji i zastosowanych stężeń) i to szybciej aniżeli w przypadku utlenienia samej lewodopy [83]. Wyniki te pokazują, że związek ten jest znacznie szybciej utleniany

przez rodniki powstające w reakcji Trindera niż przez sam enzym, tym samym zapobiegając powstaniu chromoforu Trindera poprzez redukcję rodnikowych intermediatów.

Adrenalina i noradrenalina są hormonami i neuroprzekaznikami stosowanymi również jako leki. Adrenalina była pierwszym substratem wprowadzonym przez Trindera do testów diagnostycznych do oznaczenia stężenia glukozy, jej obecność i związków analogicznych musi więc wpływać na ich wyniki w testach, w których stosuje się inne układy chromogeniczne, ponieważ związki te będą tworzyły konkurencyjne chromofory o współczynnikach absorpcji innych niż chromofor otrzymany w reakcji reporterowej [79,82,84].

Kwas 4-hydroksyfenylopirogonowy jest metabolitem w szlaku rozkładu fenyloalaniny i tyrozyny, występuje w wysokich stężeniach w moczu osób chorych na alkaptonurię leczonych nityzynonem i zaniża wyniki testów paskowych do oznaczenia glukozy [85]. U osób chorych na alkaptonurię występuje również wysokie stężenie kwasu homogentyzynowego we krwi i moczu skutkujące zaniżeniem wyników testów na kreatyninę, kwas moczowy i cholesterol [86–90]. Zaproponowanymi mechanizmami tych zakłóceń była redukcja nadtlenu wodoru w reakcji kwasu homogentyzynowego z 4-aminoantypiryną oraz utlenienie tego związku do *o*-chinonu [91], jak to wcześniej przedstawiono dla oznaczenia kwasu 5-hydroksyindoloocetowego [92]. Struktury związków opisanych w tym podrozdziale znajdują się na Rysunku 19.

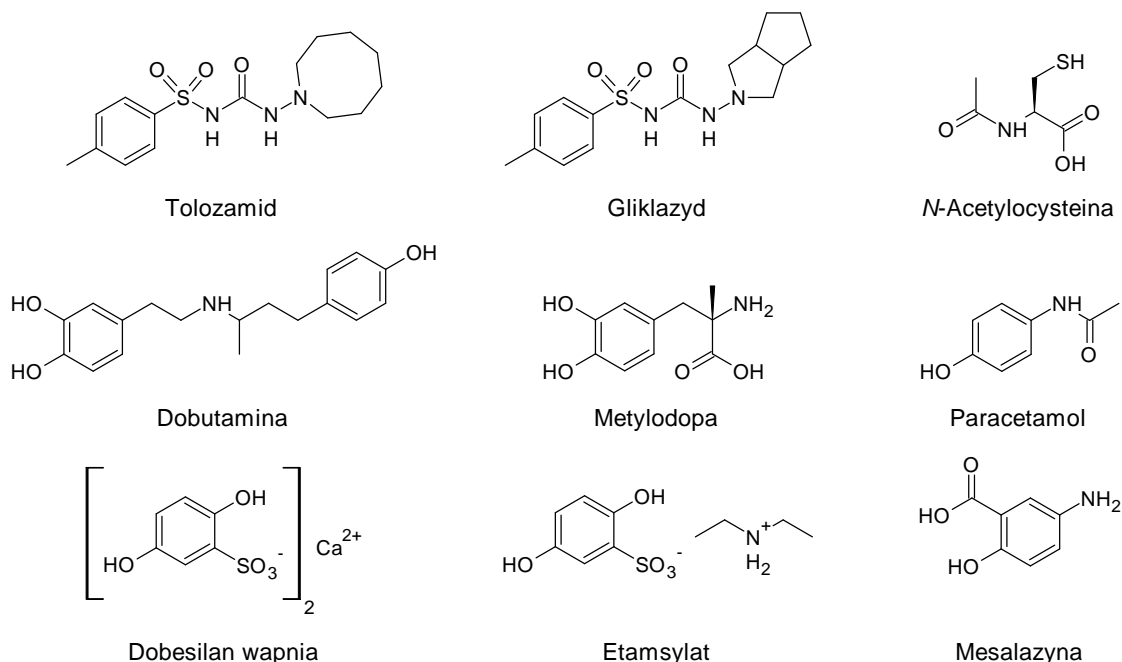


Rysunek 19. Struktury związków naturalnych wpływających na wyniki testów diagnostycznych.

1.3.2. Leki zakłócające enzymatyczne testy diagnostyczne

Od czasu wprowadzenia reakcji Trindera do standardowo wykonywanych testów diagnostycznych zaobserwowano także wpływ niektórych związków stosowanych w praktyce medycznej na uzyskiwane wyniki. Paracetamol, lek o działaniu przeciwbólowym i przeciwgorączkowym, powoduje zniżenie uzyskanego wyniku stężenia glukozy. Jego działanie jest stechiometryczne - jeden mol paracetamolu powoduje pozorny ubytek czterech moli glukozy [93]. Tolozamid [94] i gliklazyd [95], leki o działaniu przeciwcukrzycowym, zawierające ugrupowania hydrazynowe, zaniżają wyniki testów diagnostycznych do oznaczenia glukozy, w których używa się peroksydazy i ABTS-u jako jej substratu. *N*-acetylocysteina, lek o działaniu mukolitycznym, wykazał ujemny wpływ na wyniki testów do oznaczenia triacylogliceroli, cholesterolu i kwasu moczowego [96]. Dobutamina, lek stosowany w leczeniu wstrząsu kardiogenego [97], obniża uzyskiwany wynik proporcjonalnie do swojego stężenia [78] - w teście do oznaczenia kreatyniny 1 mol dobutaminy maskuje obecność czterech moli tego analitu [84]. Związek ten, tak jak dopamina, jest pochodną katecholu, który jest utleniany przez HRP do *o*-benzochinonu [98], przez to związki zawierające tę grupę są najprawdopodobniej substratami dla tego enzymu [83]. Dla dopaminy i dobutaminy zaproponowano jednak dwa różne mechanizmy zakłóceń enzymatycznych testów diagnostycznych pomimo podobieństwa ich struktury. Zaproponowano że, dobutamina jest utleniana przez peroksydazę zużywając nadtlenek wodoru konieczny do powstania chromoforu reakcji Trindera. Wniosek ten wysnuto na podstawie szybszego utlenienia dobutaminy nawet w nieobecności 4-aminoantypiryny [78]. Dla dopaminy natomiast, jak wspomniano w poprzednim podrozdziale, zaproponowano jej reakcję z produktem utlenienia 4-aminoantypiryny dającą chromofor o niższym współczynniku absorpcji przy długości fali stosowanej w pomiarach [78]. Metylodopa, lek przeciwko nadciśnieniu, powoduje obniżenie wyników testów do oznaczenia kwasu moczowego [82]. Dobesilan wapnia i etamsylat - leki o działaniu hemostatycznym (sole kwasu 2,5-dihydroksybenzenosulfonowego), obniżają wyniki testów diagnostycznych do oznaczenia kreatyniny, kwasu moczowego, triacylogliceroli i cholesterolu [99–102]. Proponowanymi mechanizmami dla dobesilanu wapnia były: jego utlenienie nadtlenkiem wodoru, reakcja z innym komponentem reakcji Trindera albo redukcja antypirylochinonoiminy [101]. Testując wpływ dobesilanu wapnia na wyniki różnych testów, z których nie wszystkie stosowały reakcję Trindera, wywnioskowano, że zakłócenie występuje na etapie powstawania barwnego produktu końcowego [102]. Mesalazyna, lek przeciwzapalny, wpływa na wyniki testów

diagnostycznych do oznaczenia kreatyniny, kwasu moczowego, kwasu mlekowego, triacylogliceroli, cholesterolu i lipazy [103]. Struktury wymienionych w tym podrozdziale związków przedstawione są na Rysunku 20.



Rysunek 20. Struktury leków wpływających na wyniki testów diagnostycznych [83].

1.3.3. Zagrożenia dla pacjentów spowodowane zakłóceniami w testach diagnostycznych

W przypadku pacjentów, którzy stosują leki zakłócające wyniki testów diagnostycznych, ważne jest aby stosować testy alternatywne. W badaniach przeprowadzonych w Brazylii stwierdzono, że spośród leków znajdujących się na liście leków podstawowych (brazylijska lista leków, które powinny znaleźć się w każdym miejskim szpitalu) aż 67,7% wpływało na wyniki przynajmniej jednego z podstawowych testów diagnostycznych [104]. Wdrożenie nieodpowiedniego leczenia na podstawie zafałszowanych wyników niesie niebezpieczeństwo niepotrzebnego narażenia pacjenta na skutki uboczne stosowanych procedur medycznych. Przykładem może być przypadek skierowania pacjenta na usunięcie lewego nadnercza, co było podyktowane wynikami testów immunologicznych. Pacjent ten brał również udział w projekcie wykorzystującym spektrometrię mas, a wyniki uzyskane w toku tego projektu były niezgodne z wynikami testów immunologicznych. Dalsze badania wykazały zafałszowanie wyniku testu immunologicznego przez nieznaną przyczynę [105]. Gdyby nie dodatkowy program, w którym pacjent brał udział, niepotrzebnie usunięto nadnercze i musiałby stawić czoła ewentualnym powikłaniom pooperacyjnym [105]. U osób

chorych na alkaptonurię możliwe jest błędne zdiagnozowanie hipourykemii na podstawie obniżonych wyników testów diagnostycznych do oznaczenia kwasu moczowego przez kwas homogentyzynowy [90]. Choć znanych jest wiele substancji zakłócających wyniki testów diagnostycznych, dopiero uzyskanie zaskakująco niskich lub ujemnych wyników skłania do ich analizy i podjęcia kroków w celu wyeliminowania zakłócenia. Niewykrycie u bezobjawowego pacjenta cholesterolu i triacylogliceroli skłoniło personel medyczny do przeprowadzenia dalszych badań, które wykazały wysokie stężenie kwasu askorbinowego w jego krwi. Po usunięciu kwasu askorbinowego oksydazą askorbinową wyniki mieściły się w normie [106]. Nagły spadek w stężeniu kreatyniny we krwi u pacjenta, nie objętego leczeniem mogącym obniżyć poziom kreatyniny, został przypisany zanieczyszczeniu pobranej próbki krwi z kaniuli tętniczej dopaminą lub dobutaminą, które były podawane przez cewnik centralny wprowadzony obwodowo w czasie pobierania krwi [107]. Brak wiedzy na temat wpływu tych związków na wyniki testów diagnostycznych nie pozwoliłby na zastosowanie odpowiednich (nie podatnych na zakłócenia powodowane przez te związki) alternatywnych metod oznaczania kreatyniny.

2. Cel pracy

Kilka lat temu zespół kierowany przez dra hab. Huberta Wojtaska wykazał, że związki naturalne i leki zawierające ugrupowanie katecholowe, takie jak karbidopa, L-dopa i dopamina, wpływają na wyniki pomiarów spektrofotometrycznych w reakcjach katalizowanych przez peroksydazy w trzech różnych układach: *o*-dianizydyna/mieloperoksydaza, ABTS/laktoperoksydaza i fenol/4-aminoantypiryna/peroksydaza chrzanowa [83]. We wszystkich układach zakłócenia te były powodowane głównie przez redukcję rodnikowych produktów utlenienia tych substratów przez ugrupowanie katecholowe, choć w niektórych przypadkach konkurencyjne utlenianie katecholi przez peroksydazy również miało istotne znaczenie. Brak świadomości zachodzenia takich reakcji doprowadził do błędnej interpretacji wyników w wielu publikacjach naukowych, szczególnie tych opisujących poszukiwania inhibitorów peroksydaz. W przypadku układu fenol/4-aminoantypiryna/peroksydaza chrzanowa zakłócenia te mają ważne znaczenie praktyczne, ponieważ jest on powszechnie stosowany w enzymatycznych testach diagnostycznych. W ciągu ponad półwiecza jego stosowania stwierdzono zakłócenia wyników takich testów powodowane przez wiele leków i związków naturalnych. Ilościowe oznaczenie analitów w tego typu testach jest pośrednie - obejmuje szereg reakcji enzymatycznych i nieenzymatycznych, które są podatne na wpływ wielu substancji. Mogą one działać jako substraty lub inhibitory jednego z enzymów, ale mogą też reagować z produktami pośrednimi lub końcowymi każdej z zachodzących reakcji. Wszystkie te zjawiska powodują zmianę końcowej wartości absorbancji, która jest mierzona w tych testach i służy do ustalenia stężenia analitu.

Do tej pory zbadano mechanizmy zakłóceń enzymatycznych testów diagnostycznych tylko dla nielicznych związków. Jako przyczynę tych efektów najczęściej proponowano bezpośrednie utlenianie związków zakłócających przez peroksydazę chrzanową lub nadtlenuk wodoru. Jednak w przypadku bilirubiny zaproponowano m.in. redukcję rodników fenoksylowych i/lub antypirylowych [75], a więc mechanizm identyczny z tym odkrytym dla katecholi [83]. Zakłócenia spowodowane takimi reakcjami można było przewidzieć przed wprowadzeniem peroksydazy chrzanowej jako enzymu reporterowego do testów diagnostycznych, ponieważ utlenianie różnych związków o właściwościach redukujących przez wygenerowane przez peroksydazy rodniki opisano już dekadę wcześniej. W roku 1959 Seymour Klebanoff opisał zjawisko przyspieszonego utlenienia adrenaliny w obecności tyroksyny i jej pochodnych w reakcjach katalizowanych przez peroksydazę chrzanową, mieloperoksydazę i laktoperoksydazę [108]. Opisał również taki sam wpływ tyroksyny

i podobnych związków fenolowych na utlenienie NADH [109] i ergotioneiny (niebiałkowego aminokwasu zawierającego grupę tiolową) [110]. Mechanizm utlenienia NADH został później wyjaśniony przez Takayamę i Nakano. Wykazali oni, że NADH zostaje utleniony przez rodnik tyroksyny wygenerowany przez peroksydazę chrzanową do rodnika NAD[•], który następnie reaguje z tlenem tworząc anionorodnik ponadtlenkowy i NAD⁺ [111]. Później inni autorzy opisali przyspieszone utlenienie L-dopy w obecności kwasów cynamonowych i ich estrów [112,113].

Porównanie struktur związków, dla których opisano zakłócenia enzymatycznych testów diagnostycznych wykorzystujących reakcję Trindera (Rysunki 19 i 20), pozwoliło stwierdzić, że prawie wszystkie mają silne właściwości redukujące. Wydawało się więc prawdopodobne, że będą one wpływały na reakcję Trindera w sposób analogiczny do bilirubiny [75] czy katecholi [83]. Uznaliśmy, że wyjaśnienie tych mechanizmów może pozwolić na przewidywanie takich zjawisk dla związków, dla których nie zostały one do tej pory wykryte. Dotychczas bowiem zakłócenia w enzymatycznych testach diagnostycznych odkrywane były głównie przypadkowo. O skali problemu mogą świadczyć dane przedstawione przez autorów publikacji opisującej wpływ dobesilanu wapnia na testy diagnostyczne stosujące reakcje Trindera. Podają oni, że tylko w szpitalu Beijing Union Medical College w ciągu roku badanych jest niemal 14 000 próbek pochodzących od pacjentów leczonych tym lekiem [102]. Pozwala to oszacować, że na świecie rocznie analizowane są miliony próbek zawierających związki mogące stanowić potencjalne źródło zakłóceń. Lekarze mogą być świadomi niebezpieczeństw płynących z zakłóceń powodowanych przez leki i związki naturalne jedynie jeśli producenci zamieszczą informację o takich zagrożeniach w instrukcjach swoich testów. Jeżeli błędne wyniki testów, spowodowane zakłóceniami, zostaną uwzględnione w diagnozie, może to doprowadzić do nieprawidłowego leczenia, a więc będzie stanowić zagrożenie dla zdrowia pacjenta.

Wybraliśmy więc kilka grup związków o właściwościach redukujących i zbadaliśmy ich wpływ na reakcję Trindera. Rozpoczęliśmy od związków z ugrupowaniem *p*-difenolowym, spośród których zakłócenia enzymatycznych testów diagnostycznych stwierdzono dla kwasu homogentyzynowego [86,88–91], kwas gentyzynowego [62,82], dobesilanu wapnia [101,102,114] i etamsylatu [64,99,100]. Kontynuowaliśmy te badania ze związkami zawierającymi ugrupowania *p*-difenolowe z bardziej rozbudowanymi strukturami, dla których zakłóceń dotychczas nie stwierdzono: antybiotyku rifampicyny oraz antracyklinowych leków przeciwnowotworowych mitoksantronu i doksorubicyny. Wybraliśmy także lek

przeciwzapalny mesalazynę, zawierającą ugrupowanie *p*-aminofenolowe. Postanowiliśmy także zweryfikować przyczyny zakłóceń powodowanych przez dopaminę i dobutaminę, dla których zaproponowano dwa różne mechanizmy [78].

W czasie trwania tych badań dotarliśmy do doniesień literaturowych opisujących hamujący wpływ innych związków o właściwościach redukujących na reakcje katalizowane przez peroksydazy. Kwas galusowy i hispidyna zostały opisane jako inhibitory peroksydazy chrzanowej [115], natomiast leki przeciwtarczycowe i ich analogi selenowe – jako inhibitory laktoperoksydazy [116]. Ponieważ wszystkie te związki również posiadają silne właściwości redukujące, uznaliśmy, że opisane mechanizmy ich działania są błędne, bo mogą one redukować rodnikowe produkty reakcji katalizowanych przez te peroksydazy, tak jak zostało to wcześniej wykazane dla katecholi [83].

3. Materiały i metody

3.1. Materiały

Peroksydaza chrzanowa (typ II, 200 U/mg), ryfampicyna (>97,0%), 4-aminoantypiryna (99%) i sól diamonowa kwasu 2,2'-azyno-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowego) (ABTS, >98%) zostały zakupione w firmie Merck. Kwas homogentyzynowy (kwas 2,5-dihydroksyfenylooctowy, >97,0%), kwas gentyzynowy (kwas 2,5-dihydroksybenzoesowy, >99,0%), dobesilan wapnia (2,5-dihydroksybenzenosulfonian wapnia, >98,0%), etamsylat (2,5-dihydroksybenzenosulfonian N,N-dietyloetyloamoniowy, >98,0%), chlorowodorek dobutaminy ((*R/S*)-4-(2-[[3-(4-hydroksyfenylo)-1-metylopropylo]amino]-etylo)benzeno-1,2-diolu, 99%), 4-(4-metoksyfenylo)butan-2-on (>99,0%), 4-*n*-butylofenol (>96,0%), hispidyna (>98,0%), mitoksantron (>97,0%), doksorubicyna (>95,0%), i mesalazyna (>98,0%) zostały nabyte w TCI (Tokyo Chemical Industry). 3,5-Dichloro-2-hydroksybenzenosulfonian sodu (DHBS, >99%) i kwas 3-hydroksy-2,4,6-trijodobenzoesowy (HTIB, >97%) zostały kupione w firmie Fluorochem. Dopaminę (4-(2-aminoetylo)benzeno-1,2-diol, >99%) i 10% Pt/C zakupiono w firmie Alfa Aesar. Metimazol (1-metylo-1,3-dihydro-2*H*-imidazolo-2-tion, 99%) i 6-*n*-propylo-2-tiouracyl (97%) zostały kupione w firmie Ambeed. Nadtlenek wodoru, fenol (cz.d.a.), *p*-krezol (>99%), 4-*tert*-butylofenol (>98%), oranż ksylenolowy (wskaźnik), sorbitol (>97%), składniki buforów i rozpuszczalniki nabyto w Avantor Performance Materials. Wodór pochodził z Linde Gaz Polska. Rozpuszczalniki deuterowane do pomiarów NMR: DMSO- d_6 (99,9% D), $CDCl_3$ (99,8% D) i D_2O (99,8% D) zakupiono w firmie Chemat. 1-metylo-1,3-dihydro-2*H*-imidazolo-2-selon, 1,2-bis(1-metylo-1*H*-imidazol-2-yl)diselenid i 1,3-dimetylo-1,3-dihydro-2*H*-imidazolo-2-selon uzyskano zostały zsyntezowane przez dr Bożenę Frąckowiak-Wojtasek.

3.2. Sprzęt

Pomiary spektrofotometryczne prowadzone były w aparatach Jasco V-630 i Jasco V-650. Pomiary magnetycznego rezonansu jądrowego prowadzone były w spektrometrze Bruker Avance 400 MHz. Widma masowe wysokiej rozdzielczości (HRMS) zostały uzyskane za pomocą aparatu Bruker Daltonic micrOTOF-Q II z jonizacją metodą elektrorozpylania (ESI) w trybie dodatniej jonizacji. Spektrometr mas był kalibrowany klastrami mrówczanu sodu. Naważki przygotowywane były na wagach WPT 06C i AS 60/220/C/2 firmy Radwag. Rozpuszczalniki odparowywane były na wyparce obrotowej Laborota Digital 4010 firmy

Heidolph chłodzonej kriostatem ALPHA RA8 Lauda. Pomiar temperatur topnienia dokonane zostały aparatem DigiMelt.

3.3. Metody ogólne

3.3.1. Pomiar spektrofotometryczny

Widma UV-Vis w zakresie 200-800 nm rejestrowane były natychmiast po wymieszaniu mieszanin reakcyjnych (czas 0') i następnie w 1 minutowych odstępach przez 10 minut. Widma mieszanin przed dodaniem enzymu również zostały zarejestrowane (czas 0). Pomiar absorbancji przy pojedynczych długościach fali zostały przeprowadzone w osobnych eksperymentach. Pomiar absorbancji rozpoczynano natychmiast po wymieszaniu mieszaniny reakcyjnej i prowadzono w sposób ciągły przez 10 minut. Wszystkie eksperymenty zostały powtórzone przynajmniej trzykrotnie.

3.3.2. Zastosowane substraty reakcji Trindera

HRP została rozpuszczona w 50 mM buforze fosforanowym o pH 7,0 w początkowym stężeniu 1 mg/ml, a następnie enzym rozcieńczono do odpowiedniego stężenia w tym samym buforze. Fenol i DHBS zostały rozpuszczone w 50 mM buforze fosforanowym o pH 7,0 w początkowym stężeniu 20 mM. HTIB został rozpuszczony w dimetylosulfotlenku (DMSO) w początkowym stężeniu 20 mM. 4-Aminoantypiryna również została rozpuszczona w DMSO w początkowym stężeniu 10 mM. Nadtlenek wodoru został przygotowany przez rozcieńczenie 30% roztworu wyjściowego do stężenia ok. 10 mM, a następnie jego stężenie zostało dokładnie ustalone za pomocą manganometrii. Pomiar absorbancji prowadzone były przy maksimum absorpcji chromoforu antypirylochinonoiminowego (505 dla reakcji z fenolem, 513 lub 512 nm dla reakcji z DHBS i 516 nm dla reakcji z HTIB).

3.3.3. Pomiar zużycia nadtlenu wodoru metodą utlenienia żelaza(II) w obecności oranżu ksylonowego (metoda FOX)

Odczynnik FOX został przygotowany poprzez zmieszanie 25 ml 5 mM oranżu ksylonowego z 25 ml 2 M sorbitolu i 1 ml 5 mM siarczanu amonowo-żelazawego (roztwory były przygotowane w 25 mM kwasie siarkowym), następnie uzupełniono mieszaninę 25 mM kwasem siarkowym do 500 ml uzyskując mieszaninę 250 μ M oranżu ksylonowego, 100 mM sorbitolu i 100 μ M siarczanu amonowo-żelazawego. Z mieszanin reakcyjnych pobierano co minutę próbki o objętości 40 μ l i mieszano z 1 ml odczynnika FOX. Po 30 minutach mierzono absorbancję przy 560 nm [117]. Stężenie nadtlenu wodoru wyznaczano na podstawie

przygotowanej krzywej wzorcowej. Stosowano jedynie wodę podwójnie destylowaną i naczynia z polipropylenu lub naczynia szklane uprzednio umyte gorącym kwasem azotowym(V).

3.4. Reakcje z prostymi *p*-difenolami

3.4.1. Reakcje utlenienia *p*-difenoli przez peroksydazę chrzanową

Reakcje były prowadzone w temperaturze pokojowej w 3 ml 50 mM buforu fosforanowego o pH 7,0 i zawierały 1% objętościowy DMSO. Kwas homogentyzynowy, kwas gentyzynowy, dobesilan wapnia i etamsylat były użyte w stężeniu 50 albo 100 μM z 50 μM nadtlaniem wodoru bez HRP lub w obecności enzymu o stężeniu 0,4 $\mu\text{g/ml}$ (0,08 U/ml) lub 2 $\mu\text{g/ml}$ (0,40 U/ml). Dodatkowo, aby przyspieszyć utlenienie kwasu gentyzynowego, dobesilanu wapnia i etamsylatu przeprowadzono reakcje ze 100 μM nadtlaniem wodoru w obecności 20 μM fenolu przy stężeniu HRP równym 2,0 $\mu\text{g/ml}$ (0,40 U/ml). Reakcje były inicjowane dodatkiem enzymu. Pomiary spektrofotometryczne były prowadzone jak opisano w podrozdziale 3.3.1, a pomiary absorpcji prowadzone były przy maksimum absorpcji *p*-chinonów (247 nm). Zużycie nadtlenu wodoru zostało oznaczone jak opisano w podrozdziale 3.3.3.

3.4.2. Wpływ *p*-difenoli na reakcje Trindera

Reakcje były prowadzone w temperaturze pokojowej w 3 ml 50 mM buforu fosforanowego o pH 7,0 i zawierały 50 μM 4-aminoantypirynę, 100 μM substrat fenolowy, 50 μM H_2O_2 i HRP w stężeniu 0,4 $\mu\text{g/ml}$ (0,08 U/ml dla fenolu) lub 2,0 $\mu\text{g/ml}$ (0,40 U/ml dla DHBS i HTIB). *p*-Difenole zostały rozpuszczone w DMSO, tak jak opisano w podrozdziale 3.3.2 uzyskując początkowe stężenie 20 mM, a następnie zostały rozcieńczone do 16, 12, 8 i 4 mM w DMSO. Końcowe stężenie DMSO w mieszaninach reakcyjnych wynosiło odpowiednio 1% objętościowy w reakcjach z fenolem i DHBS oraz 1,5% objętościowego w reakcjach z HTIB. Badane związki były stosowane w stężeniach 20, 40, 60 lub 80 μM . W przypadku dobesilanu wapnia podane stężenie odnosi się do stężenia 2,5-dihydroksybenzenosulfonianu obecnego w tej soli, co pozwala na porównanie wyników z wynikami dla pozostałych *p*-difenoli. Pomiary spektrofotometryczne były prowadzone jak opisano w podrozdziale 3.3.1, a pomiary absorpcji prowadzone były przy maksimum absorpcji chromoforów Trindera oraz osobno przy maksimum absorpcji *p*-chinonów (247 nm). Zużycie nadtlenu wodoru zostało oznaczone jak opisano w podrozdziale 3.3.3.

3.4.3. Otrzymywanie produktu utlenienia kwasu homogentyzynowego (kwasu cykloheksa-2,5-dieno-1,4-dionooctowego, kwasu *p*-benzochinonooctowego, BQA)

Kwas homogentyzynowy (33,6 mg, 0,20 mmola, 20 mM) był inkubowany przez 10 minut z H₂O₂ (24 mM, 1,2 równoważnika) i 40 µg/ml (8 U/ml) peroksydazy chrzanowej w 10 ml 100 mM buforu fosforanowego o pH 7,0. Po tym czasie mieszanina została zakwaszona stężonym HCl do uzyskania pH 2,0, a następnie została trzykrotnie poddana ekstrakcji porcjami dichlorometanu (DCM) o objętości 20 ml. Połączone fazy organiczne zostały osuszone siarczanem sodu i po przesączeniu rozpuszczalnik został odparowany na wyparce obrotowej. Uzyskano jasnożółty produkt, który powoli ciemniał po usunięciu rozpuszczalnika. Widmo ¹H NMR wskazywało na obecność zanieczyszczenia objawiającego się sygnałem przy 1,2 ppm. Produkt dodatkowo oczyszczono na kolumnie silikażelowej (0,5 g), stosując jako eluent eter dietylowy. Frakcję zawierającą produkt zebrano i odparowano rozpuszczalnik na wyparce obrotowej. Widma ¹H NMR i ¹³C NMR zostały zarejestrowane w CDCl₃. Otrzymany produkt posłużył do sprawdzenia wpływu tego związku na reakcję Trindera zawierającą 4-aminoantypirynę i fenol, tak jak opisano to w podrozdziale 3.4.2.

Wydajność: 45% (15,1 mg); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,27 (s, 1H); 6,84 (d, 1H, J = 10,1 Hz), 6,79 (dd, 1H, J = 10,1 Hz, 2,3 Hz), 6,75 (dt, 1H, J = 2,3 Hz, 1,1 Hz); 3,52 (d, 2H, J = 1,1 Hz); ¹³C NMR (100,62 MHz, CDCl₃) δ: 186,59, 185,74, 173,97, 140,73, 136,36, 136,04, 134,79, 34,13. Widma ¹H NMR i ¹³C NMR znajdują się w dodatku (Rysunki D1 i D2).

3.5. Reakcje z mesalazyną, ryfampicyną, mitoksantronem i doksorubicyną

3.5.1. Reakcje utlenienia mesalazyny, ryfampicyny, mitoksantronu i doksorubicyny przez peroksydazę chrzanową

Reakcje były prowadzone w temperaturze pokojowej w 3 ml 50 mM buforze fosforanowym o pH 7,0 i zawierały 2% objętościowe DMSO. Mesalazyna, ryfampicyna i mitoksantron były użyte w stężeniu 40 µM, a doksorubicyna była użyta w stężeniu 50 µM z 50 µM nadtlenkiem wodoru bez HRP lub w obecności enzymu o stężeniu 0,5 µg/ml (0,1 U/ml). Dodatkowo aby przyspieszyć utlenienie doksorubicyny przeprowadzono reakcje w obecności 100 µM fenolu, analogicznie jak opisano dla kwasu gentyzynowego w podrozdziale 3.4.1. Reakcje były inicjowane dodatkiem enzymu. Pomiar spektrofotometryczne były prowadzone jak opisano w podrozdziale 3.3.1.

3.5.2. Wpływ mesalazyny, ryfampicyny, mitoksantronu i doksorubicyny na reakcje Trindera

Reakcje były prowadzone w temperaturze pokojowej w 3 ml 50 mM buforu fosforanowego o pH 7,0 i zawierały 50 μ M 4-aminoantypirynę, 100 μ M fenolu lub DHBS (dodatkowe pomiary dla mesalazyny i ryfampicyny), 50 μ M H₂O₂ i HRP w stężeniu 0,5 μ g/ml (0,1 U/ml) lub 3,0 μ g/ml (0,60 U/ml dla DHBS). Związki zostały rozpuszczone w DMSO uzyskując początkowe stężenie 4 mM, a następnie zostały rozcieńczone do 3, 2 i 1 mM w DMSO. Końcowe stężenie DMSO w mieszaninach reakcyjnych wynosiło 2% objętościowe. Badane związki były stosowane w stężeniach 20, 40, 60 i 80 μ M. Pomiary spektrofotometryczne były prowadzone jak opisano w podrozdziale 3.3.1, a pomiary absorbancji prowadzone były przy maksimum absorpcji chromoforów reakcji Trindera.

3.6. Reakcje z dopaminą, dobutaminą i jej metylovaną pochodną

3.6.1. Synteza metylowanego analogu dobutaminy ((*R/S*)-4-(2-{[4-(4-metoksyfenylo)butan-2-ylo]amino}etylo)benzeno-1,2-diolu)

503,4 mg Dopaminy (2,65 mmol), 562 μ l 4-(4-metylofenylo)but-2-onu (3,18 mmol, 1,20 równoważnika), 7,84 mg 10% Pt/C, 13,8 μ l 50% NaOH w wodzie demineralizowanej i 10 ml metanolu zmieszano w kolbie okrągłodennej pod atmosferą azotu. Następnie zastąpiono atmosferę azotu wodorem. Mieszanina reakcyjna była mieszana na mieszadle magnetycznym przez 24 godziny i przebieg reakcji został zatrzymany poprzez dodanie 24 μ l 36% kwasu solnego. Atmosfera wodoru została zastąpiona argonem. Mieszaninę poreakcyjną przepuszczono przez warstwę Celitu 545 stosując do przemycia zakwaszony metanol. Rozpuszczalnik został odparowany na wyparce próżniowej. Uzyskano 399,6 mg czystego produktu.

Wydajność: 43%; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ : 8,99 (m, 4H), 7,19 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 6,89 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 6,72 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 6,68 (d, J = 2,1 Hz, 1H), 6,53 (dd, J = 8,0, 2,1 Hz, 2H), 3,75 (s, 3H), 3,15 (m, 1H), 3,04 (m, 2H), 2,82 (m, 2H), 2,69 (m, 1H), 2,09 (m, 1H), 2,54 (m, 1H, nachodzi na sygnał DMSO, w przypadku dobutaminy sygnał ten pojawia się przy 2,44 ppm i jest wyraźnie widoczny), 2,09 (m, 1H), 1,76 (m, 1H), 1,32 (d, J = 6,5 Hz, 3H). ¹³C NMR (100,62 MHz, DMSO-d₆) δ : 157,60, 145,34, 144,10, 132,68, 129,25, 127,93, 119,24, 116,10, 115,74, 113,84, 55,01, 52,86, 45,32, 34,20, 31,20, 29,94, 15,52. Widma ¹H NMR i ¹³C NMR znajdują się w dodatku (Rysunki D3 i D4).

HRMS (+ESI): m/z wyliczone dla C₁₉H₂₆NO₃ [M+H]⁺ 316,1907, m/z zmierzone 316,1928.

3.6.2. Reakcje utlenienia dopaminy, dobutaminy i jej metylowanej pochodnej przez peroksydazę chrzanową

Reakcje były prowadzone w temperaturze pokojowej w 3 ml 50 mM buforu fosforanowego o pH 7,0. Dopamina, dobutamina i metylowana pochodna dobutaminy były użyte w stężeniu 100 μM z 200 μM nadtlaniem wodoru, w obecności 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (0,1 U/ml) HRP. W celu sprawdzenia wpływu fenolu dopaminy, dobutaminy i jej metylowanej pochodnej reakcje utlenienia przeprowadzono w obecności 100 μM fenolu. Reakcje były inicjowane dodatkiem enzymu. Pomiar spektrofotometryczny był prowadzony jak opisano w podrozdziale 3.3.1, a pomiary absorbancji prowadzone były przy maksimum absorpcji dopaminochromu (475 nm dla dopaminy) i chromoforu typu adrenochromu (485 nm dla dobutaminy i jej metylowanego analogu). Zużycie nadtlenu wodoru zostało oznaczone jak opisano w podrozdziale 3.3.3.

3.6.3. Wyznaczenie molowych współczynników absorpcji

W celu wyznaczenia molowych współczynników absorpcji produktów utlenienia badanych katecholamin przeprowadzono reakcje ich utlenienia nadjodanem sodu. Reakcje były prowadzone w temperaturze pokojowej w 3 ml 50 mM buforu fosforanowego o pH 7,0. Nadjodan sodu został rozpuszczony w wodzie demineralizowanej, natomiast dopamina, dobutamina i jego metylowany analog były rozpuszczone w 1 mM kwasie fosforowym(V), aby zapobiec autoutlenieniu ich grup katecholowych. Związki katecholowe w stężeniach 20, 40, 60, 80 i 100 μM zostały wymieszane z trzema równoważnikami nadjodanu sodu (nadmiar jednego równoważnika). Reakcje monitorowano przy 475 nm dla dopaminy i 485 nm dla dobutaminy i jej metylowanego analogu przez 2 minuty. Z maksymalnych wartości absorbancji uzyskanych w tym czasie wykreślono zależność absorbancji od stężenia substratów, na podstawie której wyznaczono z równania linii prostej współczynniki absorpcji produktów reakcji. Molowe współczynniki absorpcji wyniosły odpowiednio: 3546 (\pm 56) $\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ dla dopaminochromu, 4487 (\pm 21) $\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ dla adrenochromu uzyskanego z dobutaminy i 4227 (\pm 33) $\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ dla adrenochrome uzyskanego z metylowanego analogu dobutaminy. Do obliczeń parametrów kinetycznych użyto następujących wartości molowych współczynników absorpcji odpowiednio: 3500 $\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ dla dopaminy, 4500 $\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ dla dobutaminy i 4200 $\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ dla metylowanej pochodnej dobutaminy.

3.6.4. Wyznaczenie parametrów kinetycznych utlenienia dopaminy, dobutaminy i jej metylovanego analogu przez peroksydazę chrzanową

Reakcje były prowadzone w 50 mM buforze fosforanowym o pH 7,0 który został uprzednio odtleniony poprzez przedmuchanie azotem trwające godzinę. Ponownemu natlenieniu zapobieżono przechowując bufor pod atmosferą argonu. Peroksydaza chrzanowa została rozpuszczona w odtlenionym buforze w początkowym stężeniu 14,6 μM , a następnie rozcieńczona do 100 i 50 nM w tym samym buforze. Stężenie peroksydazy chrzanowej było oznaczone spektrofotometrycznie stosując współczynnik absorpcji wynoszący $102\,000\text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ [118]. Badane związki były rozpuszczone bezpośrednio przed pomiarami w odtlenionym buforze w stężeniach 10 mM w przypadku dopaminy i 6 mM w przypadku dobutaminy i jej metylovanego analogu.

Reakcje były prowadzone w 25 °C w 3 ml odtlenionego buforu zawierającego 200 μM H_2O_2 i 2 nM (w przypadku reakcji z dopaminą) lub 1 nM (w przypadku reakcji z dobutaminą i jej metylovanym analogiem) HPR. Dopamina była użyta w stężeniach 2, 3, 4, 5, 6, 7 i 8 mM, natomiast dobutamina i jej metylowana pochodna były użyte w stężeniach 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4 i 5 mM. Absorbancja była mierzona przy długości fali odpowiadającej maksimum absorpcji danego aminochromu przez okres 5 minut. Szybkość początkowa (V_0) została wyznaczona z pierwszych 60 s pomiarów używając wyznaczonych molowych współczynników absorpcji (podrozdział 3.6.2). Prędkość maksymalna (V_{max}) i stała Michaelisa (K_M) zostały wyznaczone z wykresów Hanesa-Woolfa.

3.6.5. Wpływ dopaminy, dobutaminy i jej metylowanej pochodnej na reakcje Trindera

Reakcje były prowadzone w temperaturze pokojowej w 3 ml 50 mM buforu fosforanowego o pH 7,0 i zawierały 50 μM 4-aminoantypirynę, 100 μM fenol, 50 μM nadtlenek wodoru i 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (0,1 U/ml) HRP. Badane związki były stosowane w stężeniach 20, 40, 60 lub 80 μM . Reakcje były inicjowane dodatkiem enzymu. Pomiary spektrofotometryczne były prowadzone jak opisano w podrozdziale 3.3.1, a pomiary absorbancji prowadzone były przy maksimum absorpcji dopaminochromu (475 nm dla dopaminy) i chromoforu typu adrenochromu (485 nm dla dobutaminy i jej metylovanego analogu). Zużycie nadtlenku wodoru zostało oznaczone jak opisano w podrozdziale 3.3.3.

3.6.6. Dokowanie molekularne dopaminy, dobutaminy i jej metylowanego analogu do centrum aktywnego peroksydazy chrzanowej

Struktury ligandów zostały przygotowane za pomocą serwisu CACTUS stosując zapis SMILES (<https://cactus.nci.nih.gov/translate/>). Dokowanie molekularne zostało przeprowadzone z wykorzystaniem programu AutoDock v.4.2 [119], stosując protokół dokowania z uwzględnieniem cząsteczek wody [120]. Jako model HRP użyto strukturę krystaliczną peroksydazy chrzanowej C1A związek I (PDB: 1HCH) [29]. Brakujące protony i ładunki zostały dodane za pomocą AutoDockTools v.1.5.6 [121], stosując standardowe ustawienia. Ładunki żelaza hemowego i związanego z nim atomu tlenu zostały zmodyfikowane [122], tak aby lepiej odwzorować strukturę związku I. W parametrach dokowania centrum siatki zostało ustawione na 2,708, 2,868, 5,332, a jej rozmiar został ustawiony na 50×50×50 punktów przy odstępnie ustawionym na 0,375 Å. Dokowanie było przeprowadzone z wykorzystaniem genetycznego algorytmu Lamarka (Lamarckian Genetic Algorithm, LGA) uzyskując 200 konformacji dla każdego związku. Podobne pozycje ligandów w centrum katalitycznym zostały podzielone na klastry. Model stosowany w tym dokowaniu molekularnym został sprawdzony poprzez odtworzenie pozycji kwasu benzhydroksamowego ze struktury krystalicznej [PDB: 2ATJ] [30], w którym uzyskano energię wiązania -7,95 kcal/mol i wartość RMSD 0,6286 Å. Rysunki zostały przygotowane w programie PyMOL v.4.0.

3.7. Reakcje z kwasem galusowym, kwasem kawowym i hispidyną

3.7.1. Reakcje utlenienia kwasu galusowego, kwasu kawowego i hispidyny przez peroksydazę chrzanową

Reakcje były prowadzone w temperaturze pokojowej w 3 ml 50 mM buforu fosforanowego o pH 7,0 zawierającego 1% objętościowy etanolu. HRP oraz nadtlenek wodoru zostały przygotowane jak opisano w podrozdziale 3.3.2. Kwas galusowy, kwas kawowy i hispidyna zostały rozpuszczone w 96% etanolu w początkowym stężeniu 5 mM. Stężenie badanych związków w mieszaninie reakcyjnej wynosiło 50 µM, stężenie nadtlenu wodoru wynosiło 50 µM a stężenie HRP wynosiło 3,0 µg/ml (0,60 U/ml, dla wszystkich związków) lub 50 ng/ml (10 mU/ml, dodatkowo dla reakcji z kwasem kawowym) lub 30 ng/ml (6,0 mU/ml, dodatkowo dla reakcji z hispidyną). Reakcje były inicjowane dodatkiem enzymu. Pomiar spektrofotometryczny był prowadzony jak opisano w podrozdziale 3.3.1. Zużycie nadtlenu wodoru zostało oznaczone jak opisano w podrozdziale 3.3.3.

3.7.2. Wpływ kwasu galusowego, kwasu kawowego i hispidyny na reakcję utlenienia 4-aminoantypiryny i 3,5-dichloro-2-hydroksybenzenosulfonianu sodu przez peroksydazę chrzanową

Reakcje były prowadzone w temperaturze pokojowej w 3 ml 50 mM buforu fosforanowego o pH 7,0 zawierającego 1% objętościowy etanolu. HRP oraz nadtlenek wodoru zostały przygotowane jak opisano w podrozdziale 3.3.2. Kwas galusowy, kwas kawowy i hispidyna zostały przygotowane jak opisano w podrozdziale 3.7.1. 4-Aminoantypiryna i DHBS zostały rozpuszczone w 50 mM buforze fosforanowym o pH 7,0 w początkowym stężeniu odpowiednio 5 i 10 mM. Mieszanina reakcyjna zawierała 50 μ M 4-aminoantypirynę, 100 μ M DHBS, 50 μ M nadtlenek wodoru i 3,0 μ g/ml HRP (0,6 U/ml). Badane związki były stosowane w stężeniach 20, 40, 60 lub 80 μ M. Pomiar spektrofotometryczny był prowadzony tak jak opisano w podrozdziale 3.3.1, a pomiary absorbancji prowadzone były przy maksimum absorpcji chromoforu reakcji Trindera (512 nm). Zużycie nadtlenu wodoru zostało oznaczone tak jak opisano w podrozdziale 3.3.3.

3.7.3. Utlenienie kwasu galusowego, kwasu kawowego i hispidyny z 4-aminoantypiryną lub 3,5-dichloro-2-hydroksybenzenosulfonianem sodu

Reakcje były prowadzone w temperaturze pokojowej w 3 ml 50 mM buforu fosforanowego o pH 7,0 zawierającego 1% objętościowy etanolu. Odczynniki przygotowano jak opisano uprzednio. Mieszanina reakcyjna zawierała badany związek o stężeniu 50 μ M, 50 μ M nadtlenek wodoru, 3,0 μ g/ml HRP (0,60 U/ml) i 50 μ M 4-aminoantypirynę lub 100 μ M DHBS. Reakcje były inicjowane dodatkiem enzymu. Pomiar spektrofotometryczny był prowadzony jak opisano w podrozdziale 3.3.1. Zużycie nadtlenu wodoru zostało oznaczone jak opisano w podrozdziale 3.3.3.

Reakcje te były powtórzone stosując nadjodan sodu jako czynnik utleniający, którego roztwór został przygotowany w wodzie demineralizowanej w początkowym stężeniu 5 mM. Badane związki były utleniane przez 1 równoważnik nadjodanu sodu, a 4-aminoantypiryna i/lub DHBS były dodawane przed lub po dodaniu nadjodanu sodu w różnych odstępach czasu (1-3 minuty). Pomiar spektrofotometryczny był prowadzony jak opisano w podrozdziale 3.3.1. Gdy nie obserwowano zmian widm, dodawano kolejny równoważnik nadjodanu sodu i pomiary kontynuowano.

3.8. Reakcje z metimazolem i jego analogami selenowymi

3.8.1. Reakcje z kationorodnikiem ABTS wygenerowanym chemicznie

ABTS i nadsiarczan potasu rozpuszczono w wodzie dejonizowanej w stężeniu odpowiednio 7 mM i 20 mM. Roztwory te wymieszano i rozcieńczono uzyskując mieszaninę 5 mM ABTS i 2,5 mM $K_2S_2O_8$. Tę mieszaninę trzymano w ciemności w temperaturze pokojowej przez 12–16 godzin. Badane związki rozpuszczono w wodzie dejonizowanej w stężeniu 500 μ M. Następnie zmieszano je w różnych stężeniach z roztworem $ABTS^{*+}$ w 3 ml 50 mM buforu fosforanowym o pH 7,0. $ABTS^{*+}$ zastosowano w stężeniu dającym absorbancję początkową równą 0,8 (ok. 25 μ M), a badane związki stosowano w stężeniach: 2,5, 5 i 10 μ M. Absorbancję przy 415 nm mierzono przez 10 minut.

3.8.2. Pomiary NMR reakcji utlenienia mieszanin ABTS i 1,2-bis(1-metylo-1*H*-imidazol-2-yl)diselenid przez peroksydazę chrzanową

Granica rozpuszczalności $ABTS^{*+}$ w wodzie lub buforze wynosi około 7 mM. W wysokich stężeniach ma również szkodliwy wpływ na jakość widm NMR. Dlatego wytworzono go *in situ* w znacznie niższych stężeniach przez utlenianie 100 μ M ABTS nadtlaniem wodoru i 100 μ g/ml (20 U/ml) HRP w 100 mM buforze fosforanowym o pH 7,0 (bufor przygotowano w H_2O , zmierzono pH, próbkę zliofilizowano i rozpuszczono w D_2O). Związek zastosowano w stężeniu 5 mM z 10, 15 i 25 mM H_2O_2 . W tych warunkach sygnały ABTS również nie przesłaniały widm. Przeprowadzono także reakcje w D_2O (bez buforu) ze 100 μ M ABTS, 100 μ g/ml (20 U/ml) HRP i 10, 15 i 25 mM H_2O_2 . Przeanalizowano również reakcje badanego związku z samym H_2O_2 w stężeniu 15 mM. Reakcje inicjowano dodatkiem H_2O_2 , a próbkę umieszczano natychmiast w spektrometrze NMR i rejestrowano widma co 10 min przez 1 h, a następnie po 2 i 22-24 h w temperaturze 20 °C. W przypadku reakcji z 5 mM DTT związek inkubowano z 15 mM H_2O_2 , 100 μ M ABTS i 100 μ g/ml (20 U/ml) HRP przez 10, 30, 60, 90 lub 120 min, następnie dodano DTT w celu uzyskania końcowego stężenie 25 mM i widma rejestrowano natychmiast (w ciągu 5 minut). Przesunięcia chemiczne podano w odniesieniu do sygnału H_2O (4,79 ppm).

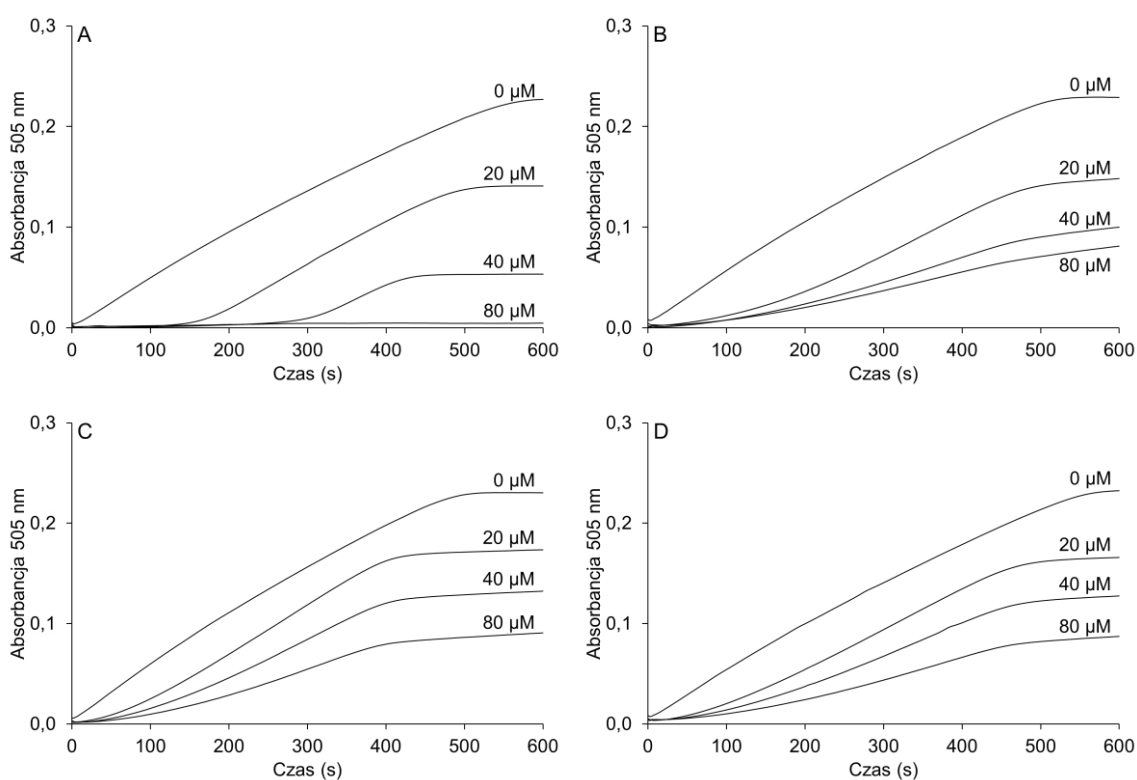
3.8.3. Wpływ 6-*n*-propylo-2-tiouracylu, metimazolu i jego selenowych analogów na reakcję Trindera

Reakcje były prowadzone w temperaturze pokojowej w 3 ml 50 mM buforu fosforanowego o pH 7,0 i zawierały 50 μM 4-aminoantypirynę, 100 μM fenol, 50 μM H_2O_2 i HRP w stężeniu 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (0,1 U/ml). Związki zostały rozpuszczone w DMSO uzyskując początkowe stężenie 8 mM, a następnie zostały rozcieńczone do 6, 4, 2 i 1 mM w DMSO. Końcowe stężenie DMSO w mieszaninach reakcyjnych wynosiło 1% objętościowy. Badane związki były stosowane w stężeniach 20, 40, 60 i 80 μM . Pomiar spektrofotometryczny był prowadzony jak opisano w podrozdziale 3.3.1, a pomiary absorbancji prowadzone były przy maksimum absorpcji chromoforu reakcji Trindera.

4. Wyniki

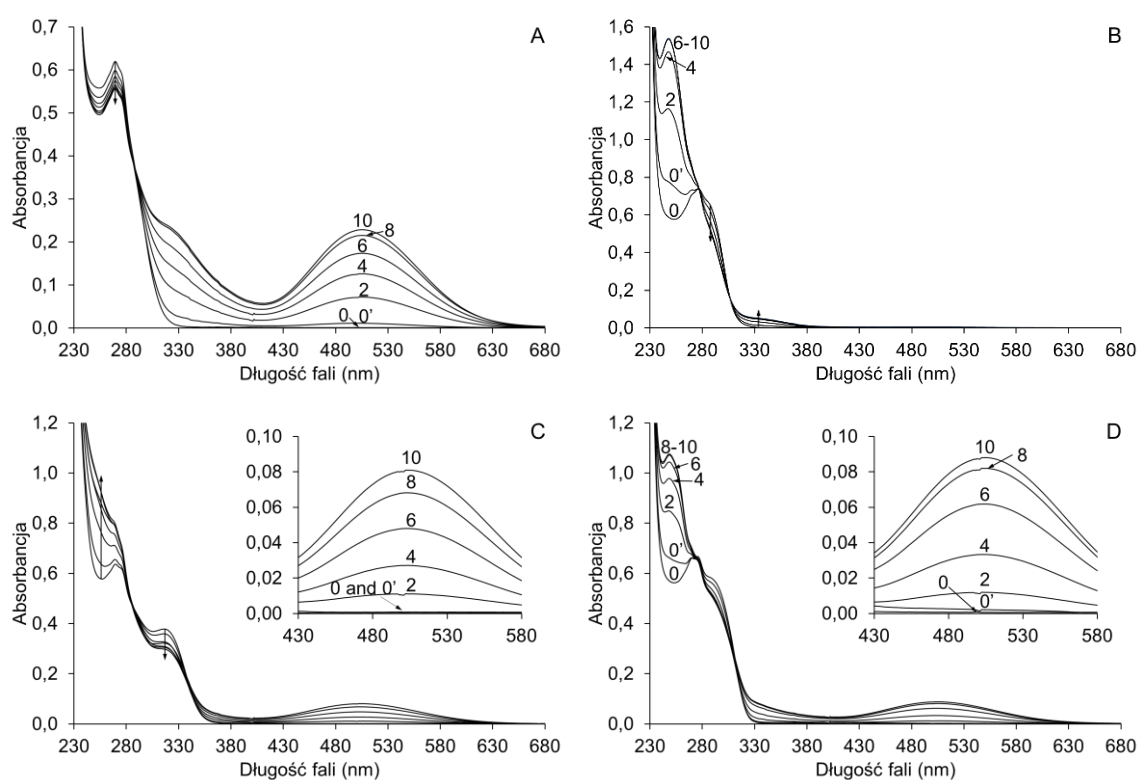
4.1. Reakcje z prostymi *p*-difenolami

Wszystkie badane *p*-difenole hamowały powstawanie chromoforu antypirylochinonoiminowego w układzie 4-aminoantypiryna/fenol, tak jak zostało to poprzednio stwierdzone w komercyjnych testach diagnostycznych [86,88,90,91,99–102,114,123]. Jednak wpływ kwasu homogentyzynowego był inny niż pozostałych związków. W obecności tego związku w początkowym etapie reakcji nie było przyrostu absorbancji przy 505 nm. Jednak po czasie proporcjonalnym do stężenia kwasu homogentyzynowego przyrost absorbancji następował z szybkością porównywalną do reakcji kontrolnej (Rysunek 21A). Natomiast kwas gentyzynowy, dobesilan wapnia i etamsylat nie hamowały całkowicie przyrostów absorbancji, a jedynie zmniejszały te przyrosty w stopniu proporcjonalnym do ich stężenia (Rysunek 21B-D). W widmach zarejestrowanych dla reakcji w obecności badanych *p*-difenoli w stężeniu



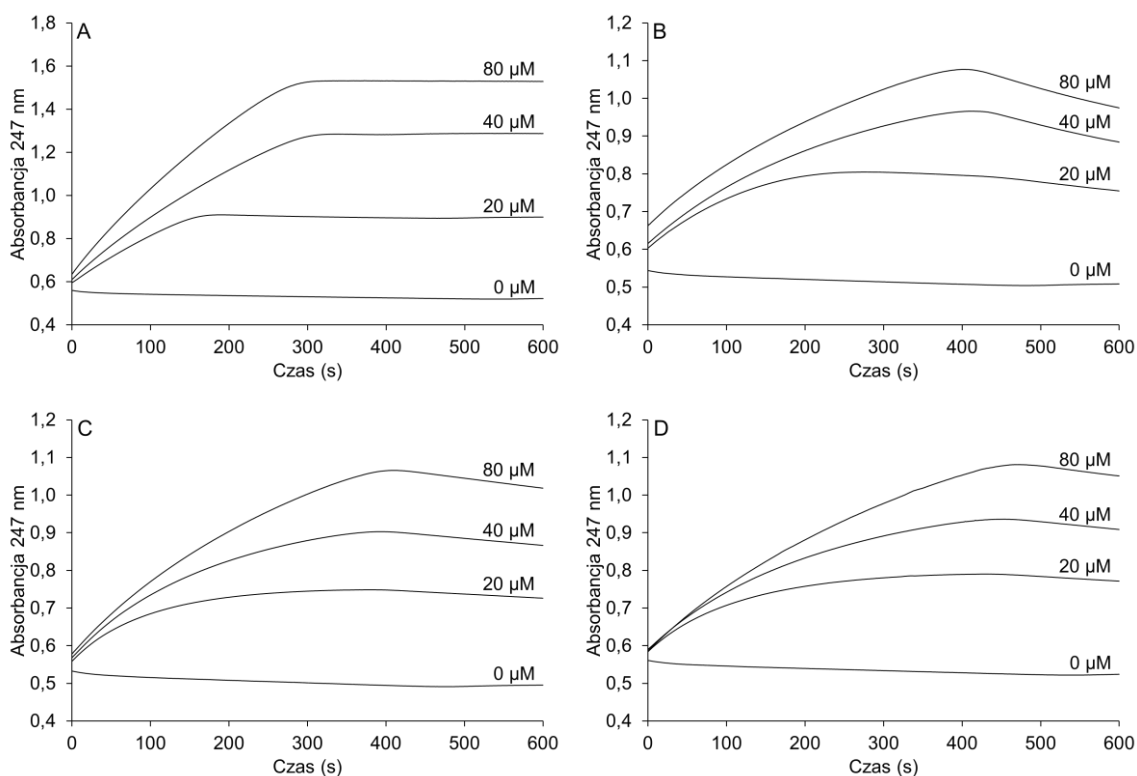
Rysunek 21. Wpływ badanych *p*-difenoli na formowanie się chromoforu reakcji Trindera składającej się z 4-aminoantypiryny i fenolu. Mieszanki reakcyjne składały się z 50 μM 4-aminoantypiryny, 100 μM fenolu, 50 μM H_2O_2 i 0,4 $\mu\text{g/ml}$ HRP bez badanych związków (0 μM) lub z kwasem homogentyzynowym (A), kwasem gentyzynowym (B), dobesilanem wapnia (C) albo etamsylatem (D) o stężeniu podanym przy każdej krzywej.

80 μM (Rysunek 22) zaobserwowano, że mniejszym przyrostom absorbancji w pasmie absorpcji chromoforu antypirylochinonoiminowego (505 nm) lub ich braku dla kwasu homogentyzynowego towarzyszył wzrost absorbancji w regionie charakterystycznym dla *p*-chinonów (maksimum przy 247 nm) [124,125]. Pomiary punktowe zmian absorbancji przy tej długości fali (Rysunek 23) pozwoliły stwierdzić, że dla reakcji z kwasem homogentyzynowym okres powstawania jego *p*-chinonu był prawie identyczny z okresem braku tworzenia chromoforu reakcji Trindera (Rysunek 21A). Dla reakcji w obecności pozostałych *p*-difenoli takich zależności nie stwierdzono. Porównanie zmian absorbancji przy 505 nm i 247 nm dla reakcji w obecności kwasu gentyzynowego, dobessilanu wapnia i etamsylatu pozwoliło stwierdzić, że w reakcjach z tymi *p*-difenolami tworzenie *p*-chinonów i antypirylochinonoiminy odbywa się jednocześnie do momentu wyczerpania nadtlenu wodoru. To odmienne działanie można wyjaśnić właściwościami elektrochemicznymi tych

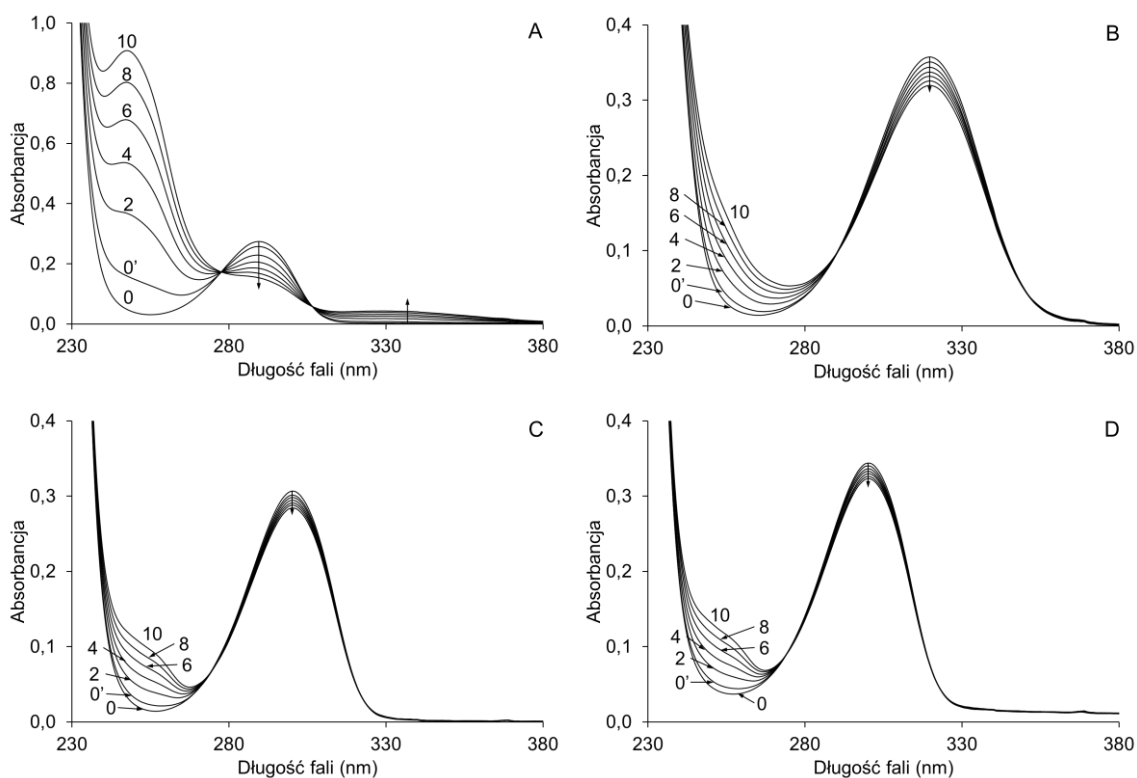


Rysunek 22. Wpływ badanych *p*-difenoli na tworzenie się chromoforu reakcji Trindera składającej się z 4-aminoantypiryny i fenolu. Mieszanki reakcyjne składały się z 50 μM 4-aminoantypiryny, 100 μM fenolu, 50 μM H_2O_2 i 0,4 $\mu\text{g/ml}$ HRP bez badanych związków (A) lub w obecności 80 μM kwasu homogentyzynowego (B), 80 μM kwasu gentyzynowego (C) lub 80 μM dobessilanu wapnia (D). Widma mieszanin reakcyjnych zarejestrowano przed dodaniem enzymu (0), od razu po dodaniu enzymu (0') i po 2, 4, 6, 8 i 10 minutach. Na wykresach C i D wstawiono powiększony fragment pasma absorpcji antypirylochinonoiminy. Widma mieszaniny reakcyjnej zawierającej etamsylat były niemal identyczne z tymi uzyskanymi dla reakcji z dobessilanem wapnia.

związków. Wykazano że jedno- i dwuelektronowy potencjał redukcyjny *p*-difenoli zależy silnie od wpływu podstawnikowego wyrażonego stałą Hammetta [126]. Podstawniki elektrodonorowe, takie jak grupa alkilowa czy alkoksylova, obniżają potencjał redukcyjny, natomiast podstawniki elektroakceptorowe, takie jak grupa karboksylowa czy sulfonowa, podwyższają potencjał redukcyjny. Dwuelektronowe potencjały redukcyjne dla badanych *p*-difenoli zostały już wyznaczone eksperymentalnie i wynoszą: dla kwasu homogentyzynowego 0,636 V [127], dla kwasu gentyzynowego 0,769 V [128], a dla kwasu 2,5-dihydroksybenzenosulfonowego 0,787 V [128]. Różnice te odzwierciedlają podatność tych związków na utlenienie i względną szybkość ich utlenienia przez utleniacze. Dla sprawdzenia tej zależności utleniono badane związki za pomocą HRP, a uzyskane wyniki są zgodne z doniesieniami literaturowymi [45,129]. Widma dla reakcji utlenienia *p*-difenoli przez HRP o dwóch stężeniach i zmiany absorbancji przy 247 nm w czasie tych reakcji przedstawione zostały na rysunkach 24, 25 i 26. Spośród tych związków jedynie kwas homogentyzynowy jest utleniany szybko, natomiast pozostałe znaczenie wolniej.

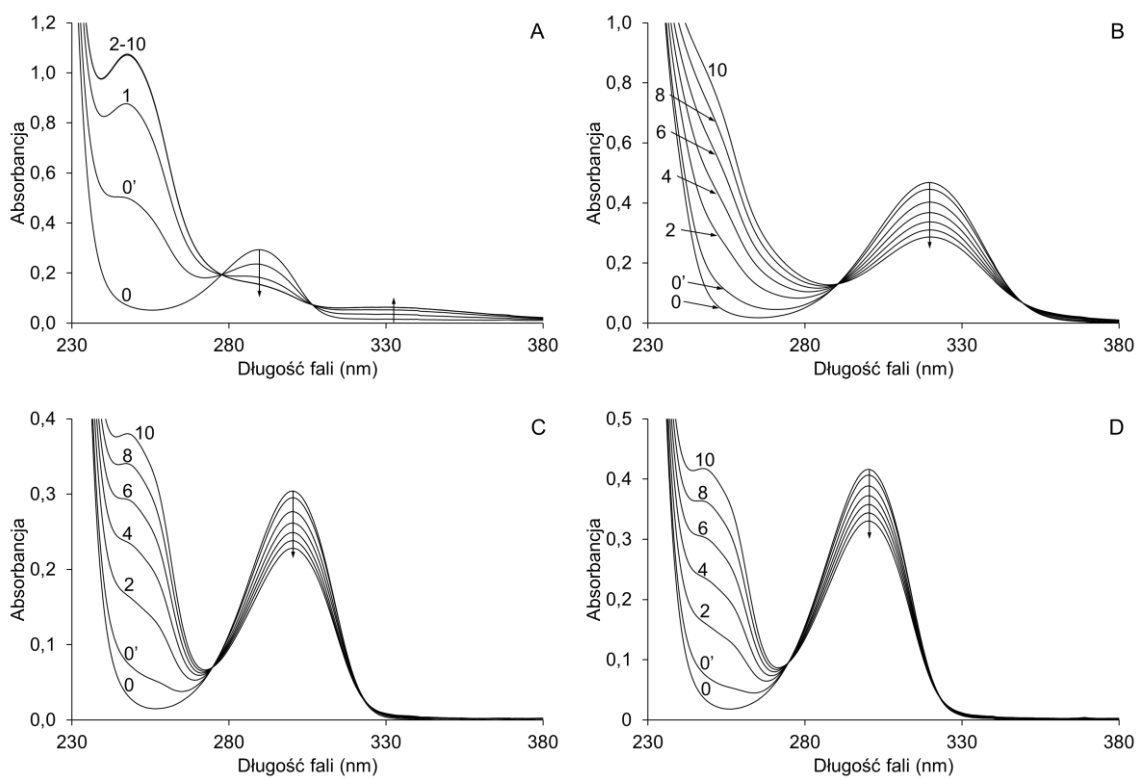


Rysunek 23. Zmiany absorbancji przy maksimum absorpcji *p*-chinonów (247 nm) w układzie reakcji Trindera składającej się z 4-aminoantypiryny i fenolu. Mieszanki reakcyjne składały się z 50 μM 4-aminoantypiryny, 100 μM fenolu, 50 μM H₂O₂ i 0,4 μg/ml HRP bez badanych związków (0 μM) lub z kwasem homogentyzynowym (A), kwasem gentyzynowym (B), dobessilanem wapnia (C) albo etamsylatem (D) o stężeniach podanym przy każdej krzywej.

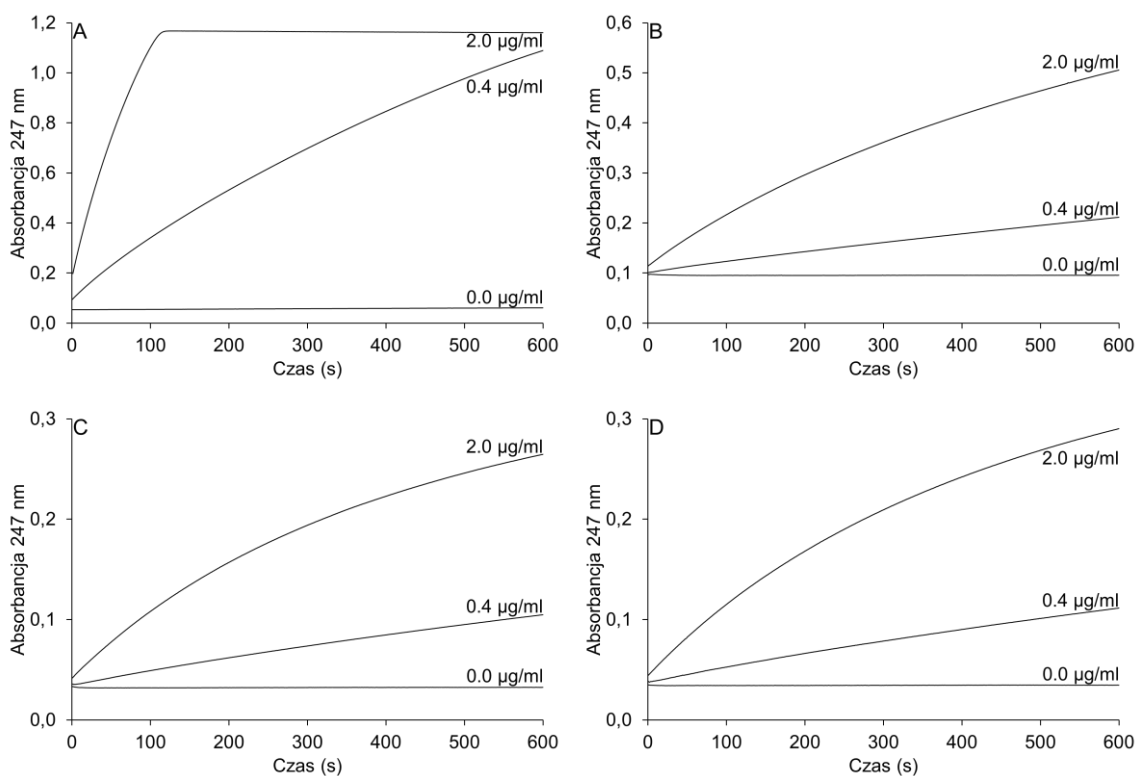


Rysunek 24. Utlenienie badanych *p*-difenoli przez peroksydazę chrzanową. Mieszanki reakcyjne zawierały 50 μM H_2O_2 i 0,4 $\mu\text{g/ml}$ HRP oraz 100 μM kwas homogentyzynowy (A), 100 μM kwas gentyzynowy (B), 100 μM dobesilan wapnia (C) lub 100 μM etamsylat (D). Widma mieszanin reakcyjnych były zarejestrowane przed dodaniem enzymu (0), od razu po dodaniu enzymu (0') i po 2, 4, 6, 8 i 10 minutach.

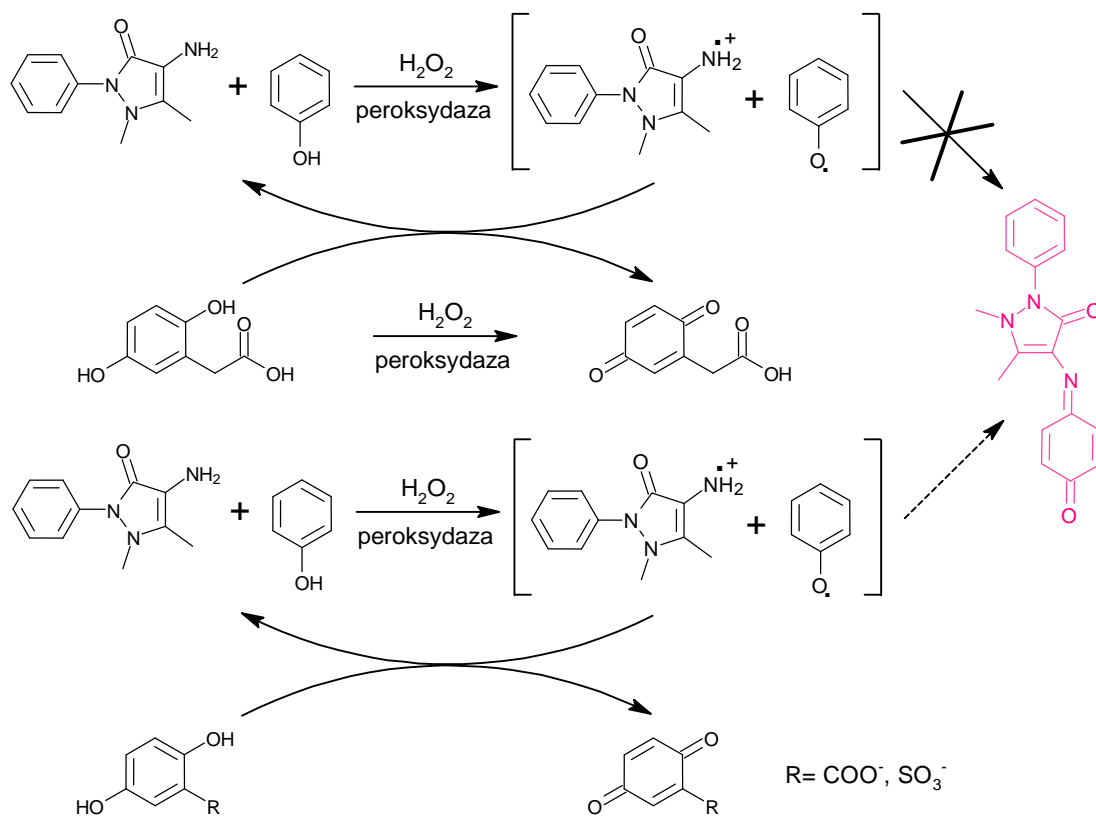
Wyniki te wskazują na to, że mechanizm wpływu kwasu homogentyzynowego na reakcję Trindera różni się od mechanizmu działania pozostałych *p*-difenoli. Kwas homogentyzynowy działa jako konkurencyjny substrat HRP, natomiast utlenienie pozostałych badanych związków przez enzym jest znikome. Dlatego ich działanie wynika prawie wyłącznie z redukcji rodnika fenoksyłowego/antypiryłowego, jak wykazano to poprzednio dla katecholi [83]. Mechanizmy te podsumowano na rysunku 27. Aby wykluczyć, że związki te są inhibitorami HRP, sprawdzono zużycie nadtlenu wodoru w trakcie tych reakcji. Wyniki tych pomiarów przedstawiono na rysunku 28. Kwas homogentyzynowy nieznacznie zwiększał szybkość zużycia nadtlenu wodoru, natomiast pozostałe *p*-difenole nie wpływały na szybkość zużycia utleniacza. Szybkości reakcji wyznaczone z tych pomiarów znajdują się w dodatku w Tabeli D1. Wyniki te jasno pokazują, że związki te nie wpływają na szybkość formowania się chromoforu reakcji Trindera poprzez inhibicję HRP.



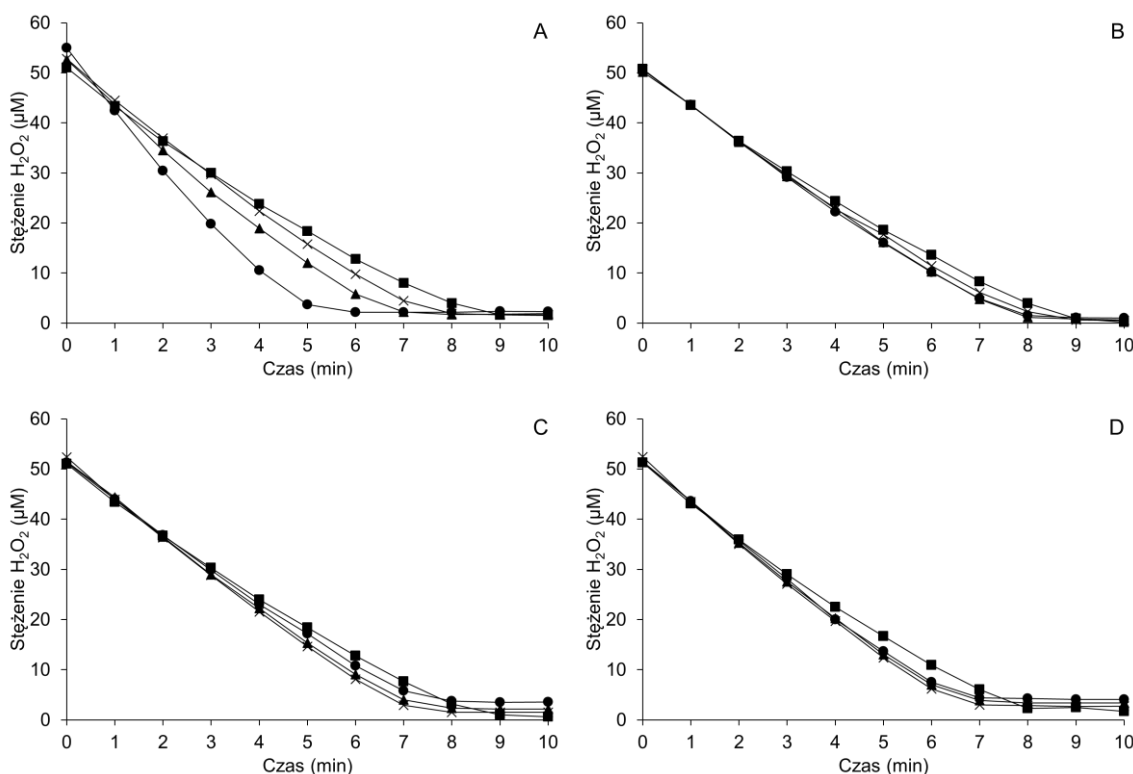
Rysunek 25. Utlenienie badanych *p*-difenoli przez peroksydazę chrzanową. Mieszanki reakcyjne zawierały 50 μM H_2O_2 i 2,0 $\mu\text{g/ml}$ HRP oraz 100 μM kwas homogentyzynowy (A), 100 μM kwas gentyzynowy (B), 100 μM dobesilan wapnia (C) albo 100 μM etamsylat (D). Widma mieszanin reakcyjnych były zarejestrowane przed dodaniem enzymu (0), od razu po dodaniu enzymu (0') i po 2, 4, 6, 8 i 10 minutach.



Rysunek 26. Utlenienie badanych *p*-difenoli przez peroksydazę chrzanową. Mieszanki reakcyjne zawierały 50 μM H_2O_2 i HRP o stężeniu podanym przy każdej krzywej oraz 100 μM kwas homogentyzynowy (A), 100 μM kwas gentyzynowy (B), 100 μM dobesilan wapnia (C) lub 100 μM etamsylat (D). Absorbancja przy 247 nm mierzona przez 10 minut.

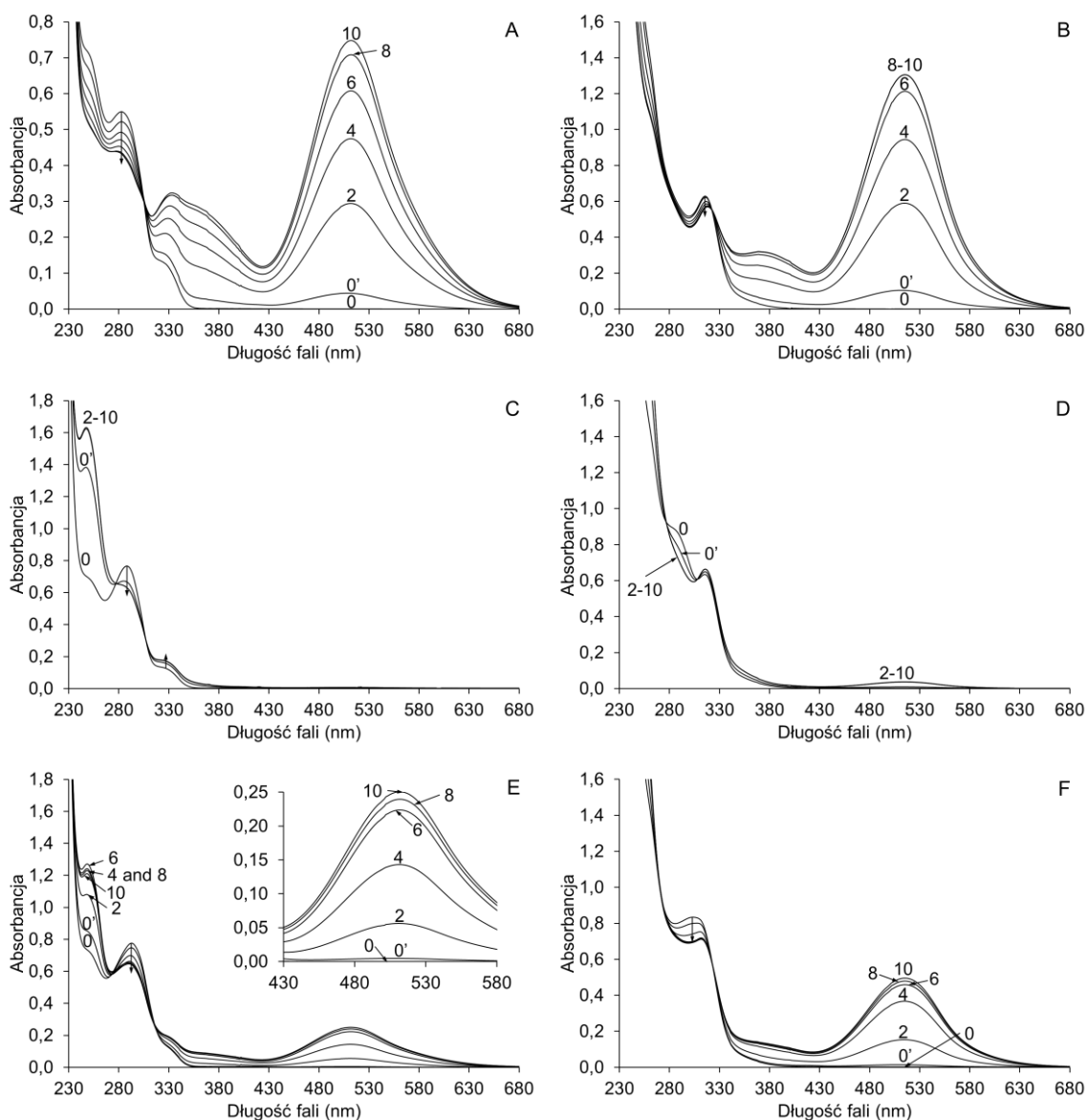


Rysunek 27. Mechanizmy zakłóceń reakcji Trindera powodowanych przez *p*-difenole.



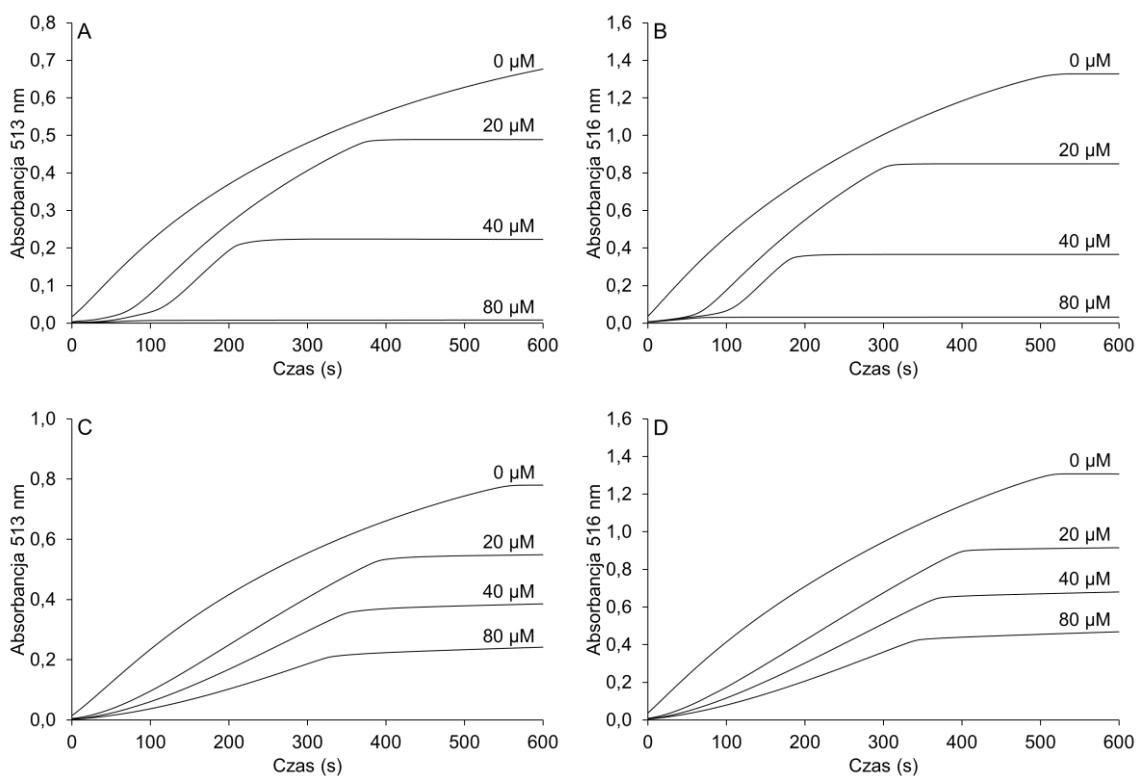
Rysunek 28. Wpływ badanych *p*-difenoli na zużycie nadtlenu wodoru w układzie reakcji Trindera składającej się z 4-aminoantypiryny i fenolu. Mieszanki reakcyjne składały się z 50 μM 4-aminoantypiryny, 100 μM fenolu, 50 μM H_2O_2 i 0,4 $\mu\text{g/ml}$ HRP bez badanych związków (■), z kwasem homogentyzynowym (A), kwasem gentyzynowym (B), dobesilanem wapnia (C) lub etamsylatem (D) o stężeniu 20 μM (×), 40 μM (▲) lub 80 μM (●).

Jak wspomniano w rozdziale 1.2.7, w reakcjach Trindera stosuje się różne pochodne fenolu, m. in. kwas 3-hydroksy-2,4,6-trijodobenzoesowy (HTIB) [64] i kwas 3,5-dichloro-2-hydroksybenzenosulfonowy (DHBS) [62]. Oba te związki zawierają podstawniki elektronoakceptorowe, wpływające znacznie na właściwości elektrochemiczne fenolu. Dlatego też sprawdzono wpływ *p*-difenoli na reakcje z udziałem tych substratów. Ponieważ związki te są wolniej utleniane przez HRP aniżeli fenol, w tych reakcjach użyto enzymu w stężeniu pięciokrotnie większym, aby zachować ten sam czas reakcji (zakończenie reakcji kontrolnych w czasie 10 minut). Widma dla reakcji 4-aminoantypiryny i DHBS (A, C i E) lub HTIB (B, D i F) w obecności kwasu homogentyzynowego (C i E) lub dobesilanu wapnia (D i F) przedstawione są na rysunku 29. Obecność kwasu homogentyzynowego powoduje brak przyrostów absorbancji w paśmie chromoforu antypirylochinonoiminowego w przypadku obu substratów. Dobesilan wapnia natomiast zmniejsza jedynie przyrosty absorbancji w tym zakresie. W widmach mieszanin reakcyjnych z *p*-difenolami i DHBS jako substratem



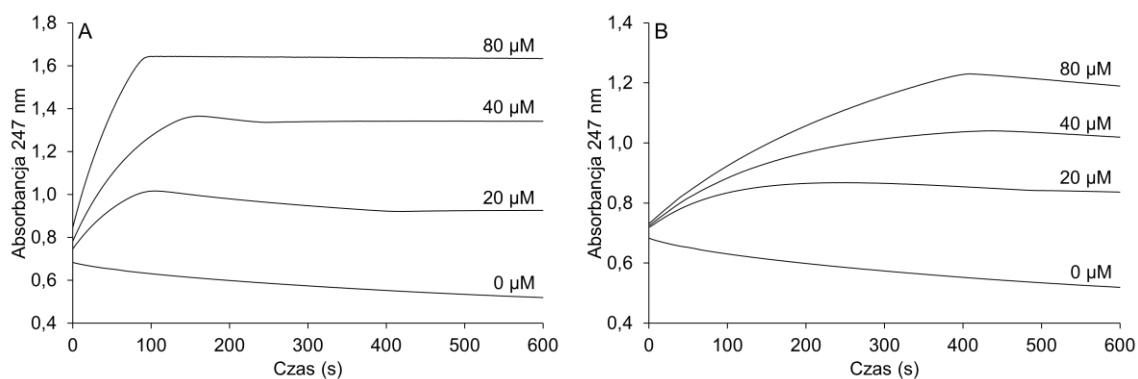
Rysunek 29. Wpływ badanych *p*-difenoli na powstawanie chromoforu reakcji Trindera składającej się z 4-aminoantypiryny i DHBS (A, C, E) lub HTIB (B, D, F). Mieszanki reakcyjne zawierały 50 μM 4-aminoantypirynę, 100 μM DHBS lub HTIB, 50 μM H_2O_2 i 2,0 $\mu\text{g/ml}$ HRP bez badanych związków (A, B), 80 μM kwas homogentyzynowy (C, D) albo 80 μM dobesilan wapnia (E, F). Widma mieszanin reakcyjnych były zarejestrowane przed dodaniem enzymu (0), od razu po dodaniu enzymu (0') i po 2, 4, 6, 8 i 10 minutach.

zauważalne są przyrosty absorbancji w zakresie *p*-chinonów (maksimum absorpcji przy 247 nm). Są one niewidoczne w reakcjach z HTIB z powodu wysokiej absorbancji tego substratu w tym zakresie. Zmiany absorbancji przy 513 nm dla układu 4-aminoantypiryny z DHBS i przy 516 nm dla układu 4-aminoantypiryny z HTIB (te długości fali odpowiadają maksimum absorpcji powstających chromoforów) w czasie reakcji w obecności wybranych

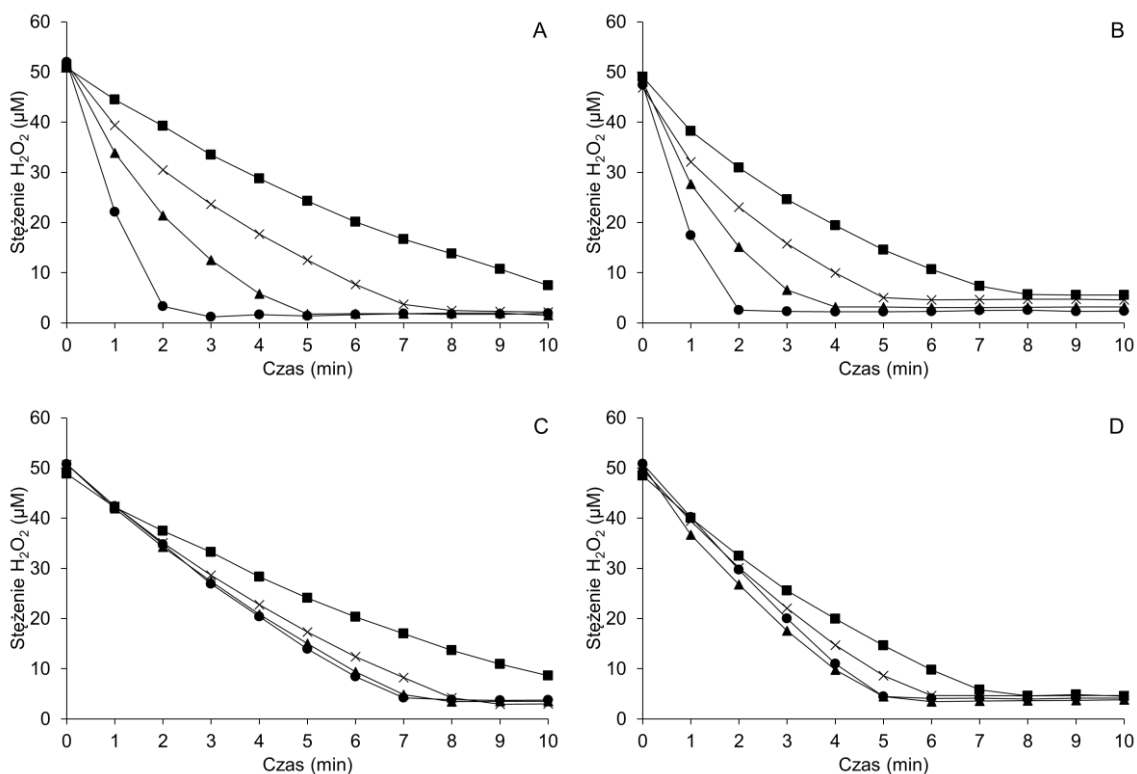


Rysunek 30. Wpływ badanych *p*-difenoli na formowanie się chromoforu reakcji Trindera składającej się z 4-aminoantypiryny i DHBS (A, C) lub HTIB (B, D). Mieszanki reakcyjne składały się z 50 μM 4-aminoantypiryny, 100 μM DHBS lub HTIB, 50 μM H_2O_2 i 2,0 $\mu\text{g/ml}$ HRP bez badanych związków (0 μM), z kwasem homogentyzynowym (A, B) albo dobesilanem wapnia (C, D) o stężeniu podanym przy każdej krzywej.

p-difenoli przedstawione są na rysunku 30. Dla kwasu homogentyzynowego obserwuje się podobny, ale silniejszy, wpływ jak w układzie z fenolem (Rysunek 21). Również występuje brak przyrostów absorbancji przy maksimum absorpcji chromoforów antypirylochinoniminyowych, jednak okres ten jest znacznie krótszy i nie jest proporcjonalny do stężenia kwasu homogentyzynowego. Wpływ dobesilanu wapnia nie różni się od jego wpływu na układ zawierający fenol. Pomiar absorbancji *p*-chinonów były możliwe jedynie w układzie zawierającym DHBS. Zmiany absorbancji przy 247 nm dla układu z DHBS przedstawione są na Rysunku 31. Szybkości przyrostów absorbancji dla reakcji z kwasem homogentyzynowym są w przybliżeniu proporcjonalne do jego stężenia, co świadczy o tym, że związek ten jest głównym substratem w tym układzie. Zależność ta nie jest widoczna w przypadku reakcji z dobesilanem wapnia, a więc i w tym układzie utlenienie dobesilanu wapnia bezpośrednio przez enzym nie ma istotnego wpływu na powstawanie chromoforu reakcji Trindera. Widoczne jest to również w pomiarach zużycia nadtlenu wodoru przedstawionych na Rysunku 32. Wartości szybkości reakcji obliczonych na podstawie tych pomiarów przedstawiono



Rysunek 31. Zmiany absorbancji przy maksimum absorpcji *p*-chinonów (247 nm) w układzie reakcji Trindera składającej się z 4-aminoantypiryny i DHBS. Mieszanki reakcyjne zawierały 50 μM 4-aminoantypirynę, 100 μM DHBS, 50 μM H_2O_2 i 2,0 $\mu\text{g/ml}$ HRP bez badanych związków (0 μM), kwas homogentyzynowy (A) albo dobesilan wapnia (B) o stężeniu podanym przy każdej krzywej.



Rysunek 32. Wpływ badanych *p*-difenoli na zużycie nadtlenu wodoru w czasie reakcji Trindera składającej się z 4-aminoantypiryny i DHBS (A, C) lub HTIB (B, D). Mieszanki reakcyjne zawierały 50 μM 4-aminoantypirynę, 100 μM DHBS lub HTIB, 50 μM H_2O_2 i 2,0 $\mu\text{g/ml}$ HRP bez badanych związków (■), kwas homogentyzynowy (A, B) albo dobesilan wapnia (C, D) o stężeniu 20 μM (×), 40 μM (▲) lub 80 μM (●).

w dodatku w Tabelach D2 i D3. Szybkości zużycia nadtlenu wodoru są znacznie większe w obecności kwasu homogentyzynowego niż w reakcji kontrolnej. Natomiast dobesilan

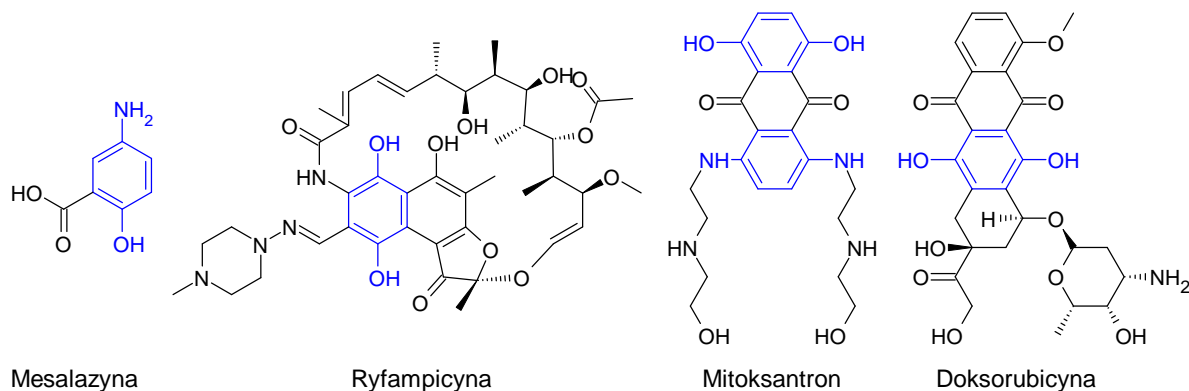
wapnia zwiększa ją tylko w niewielkim stopniu i zmiana szybkości nie jest proporcjonalna do jego stężenia. Efekt ten należy więc przypisać redukcji rodników DHBS lub HTIB, co powoduje utrzymywanie wyjściowego stężenia substratów fenolowych do momentu wyczerpania dobesilanu wapnia.

Analiza wyników zużycia nadtlenu wodoru w reakcjach Trindera i reakcjach utlenienia samych *p*-difenoli (Tabela D4) pozwala stwierdzić, że struktura związku zakłócającego i struktura substratu fenolowego mają wpływ na mechanizm zakłóceń. W układzie z fenolem zarówno bezpośrednie utlenienie kwasu homogentyzynowego jak i redukcja rodnika fenoksylowego/antypirylowego mają istotny wpływ na powstawanie chromoforu reakcji Trindera. Natomiast w układach z DHBS i HTIB (które są wolniej utleniane przez HRP niż fenol) bezpośrednie utlenienie kwasu homogentyzynowego jest głównym sposobem działania, ponieważ związek ten jest znacznie lepszym substratem niż te pochodne fenolu. Pozostałe *p*-difenole (kwas gentyzynowy, dobesilan wapnia i etamsylat) są w znikomym stopniu utleniane przez enzym we wszystkich trzech układach i dominującym mechanizmem zakłóceń jest redukcja rodników fenoksylowych/aminoantypirylowych. Redukcja ta jest jednak na tyle wolna, że pozwala na powstawanie chromoforu reakcji Trindera w całym czasie trwania reakcji. Zależność mechanizmu zakłócenia powstawania chromoforu reakcji Trindera od rodzaju zastosowanego substratu fenolowego wyjaśnia różny wpływ dobesilanu wapnia na enzymatyczne testy diagnostyczne, stosujące różne substraty reakcji Trindera, opisany wcześniej w literaturze [102].

4.2. Reakcje z mesalazyną, ryfampicyną, mitoksantronem i doksorubicyną

Chcąc sprawdzić czy zaproponowany mechanizm pozwala na przewidywanie zakłóceń reakcji Trindera wyselekcjonowano cztery związki stosowane w praktyce medycznej zawierające ugrupowania *p*-difenolowe lub *p*-aminofenolowe (Rysunek 33), dla których nie wykazano jeszcze wpływu na wyniki enzymatycznych testów diagnostycznych. Mesalazyna (kwas 5-aminosalicylowy) jest lekiem o działaniu przeciwzapalnym stosowanym w leczeniu nieswoistego zapalenia jelit i chorobie Leśniowskiego-Crohna. Ryfampicyna jest antybiotykiem o szerokim spektrum działania stosowanym w leczeniu infekcji bakteriami: *Mycobacterium tuberculosis* (głuźlica), *Mycobacterium intracellulare* razem z *Mycobacterium avium* (mykobakterioza), *Mycobacterium leprae* (trąd), *Mycobacterium lepromatosis* (trąd), *Legionella pneumophila* (choroba legionistów), *Haemophilus influenzae* (grypa) i *Neisseria meningitidis* (inwazyjna choroba meningokokowa). Mitoksantron jest stosowany w terapiach

przeciwnowotworowych przeciwko ostrej białaczce szpikowej i stwardnieniu rozsianemu. Dokсорubicyna również jest lekiem przeciwnowotworowym stosowanym przy nowotworach piersi, pęcherza moczowego i chłoniakach.

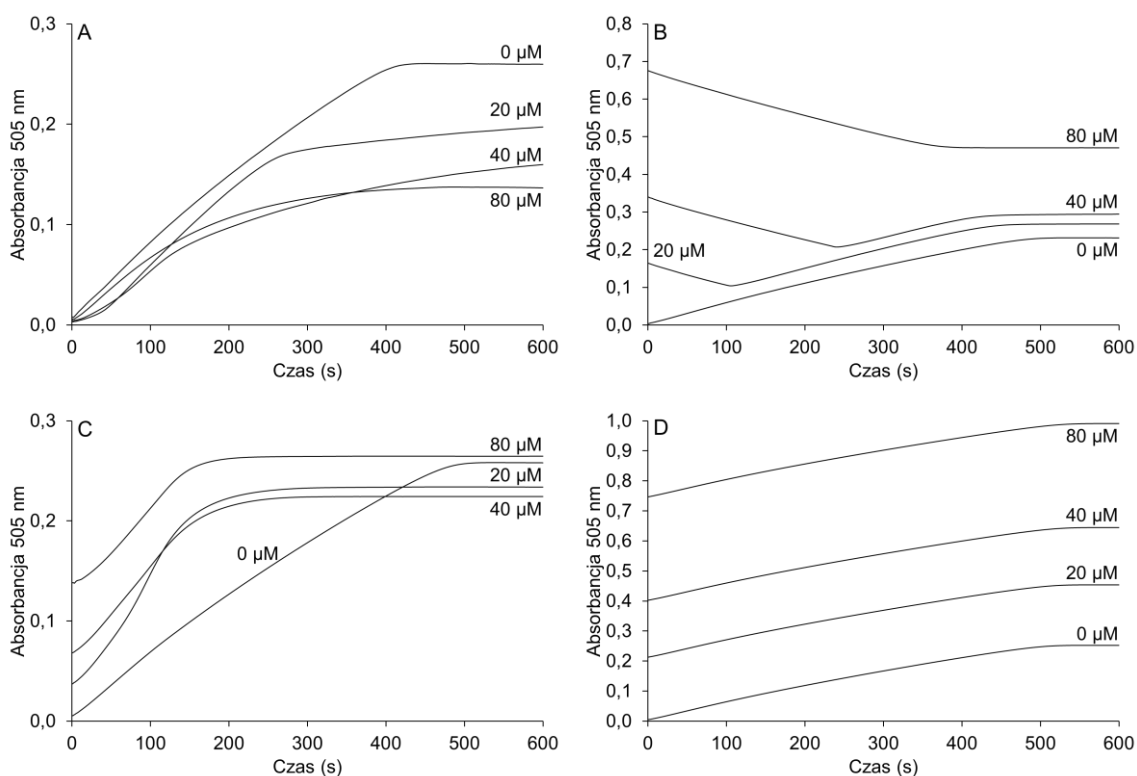


Rysunek 33. Struktury mesalazyny, ryfampicyny, mitoksantronu i dokсорubicyny. Kolorem niebieskim zaznaczono fragmenty podatne na utlenienie.

Wszystkie badane związki wpływały na zmiany absorpcji przy 505 nm (Rysunek 34), jednak każdy z nich powodował odmienny przebieg krzywych. Mesalazyna powoduje zmniejszenie końcowej absorpcji i przebieg krzywych jest nieco inny dla każdego z zastosowanych stężeń (Rysunek 34A). W widmach dla reakcji Trindera w obecności tego związku (Rysunek 35B) i w reakcji utlenienia samej mesalazyny przez HRP (Rysunek 36A) widoczny jest gwałtowny wzrost absorpcji przy 260 nm, co odpowiada w przybliżeniu maksimum absorpcji niepodstawionej chinonoiminy – 262 nm [130], która osiąga maksimum w pierwszej minucie reakcji. W widmach zarejestrowanych w czasie reakcji Trindera następują później spadki absorpcji w tym paśmie, którym towarzyszą przyrosty absorpcji w szerokim paśmie o maksimum przy około 490 nm, co sugeruje powstanie mieszaniny produktów, najprawdopodobniej w wyniku reakcji sprzężenia chinonoiminy z 4-aminoantypiryną.

Pozostałe trzy leki wykazują silną absorpcję w zakresach zbliżonych do pasma absorpcji chromoforu reakcji Trindera, dlatego ich wpływ na absorpcję przy 505 nm jest złożony. Obecność ryfampicyny powoduje spadki absorpcji przy tej długości fali w początkowej fazie reakcji a czas trwania tej fazy jest proporcjonalny do jej stężenia. Dla stężeń ryfampicyny wynoszących 20 i 40 μM po tej fazie następują przyrosty absorpcji z szybkością porównywalną do reakcji kontrolnej, a dla stężenia 80 μM wzrostu absorpcji już się nie obserwuje (Rysunek 34B). Świadczy to o powstawaniu chromoforu reakcji Trindera

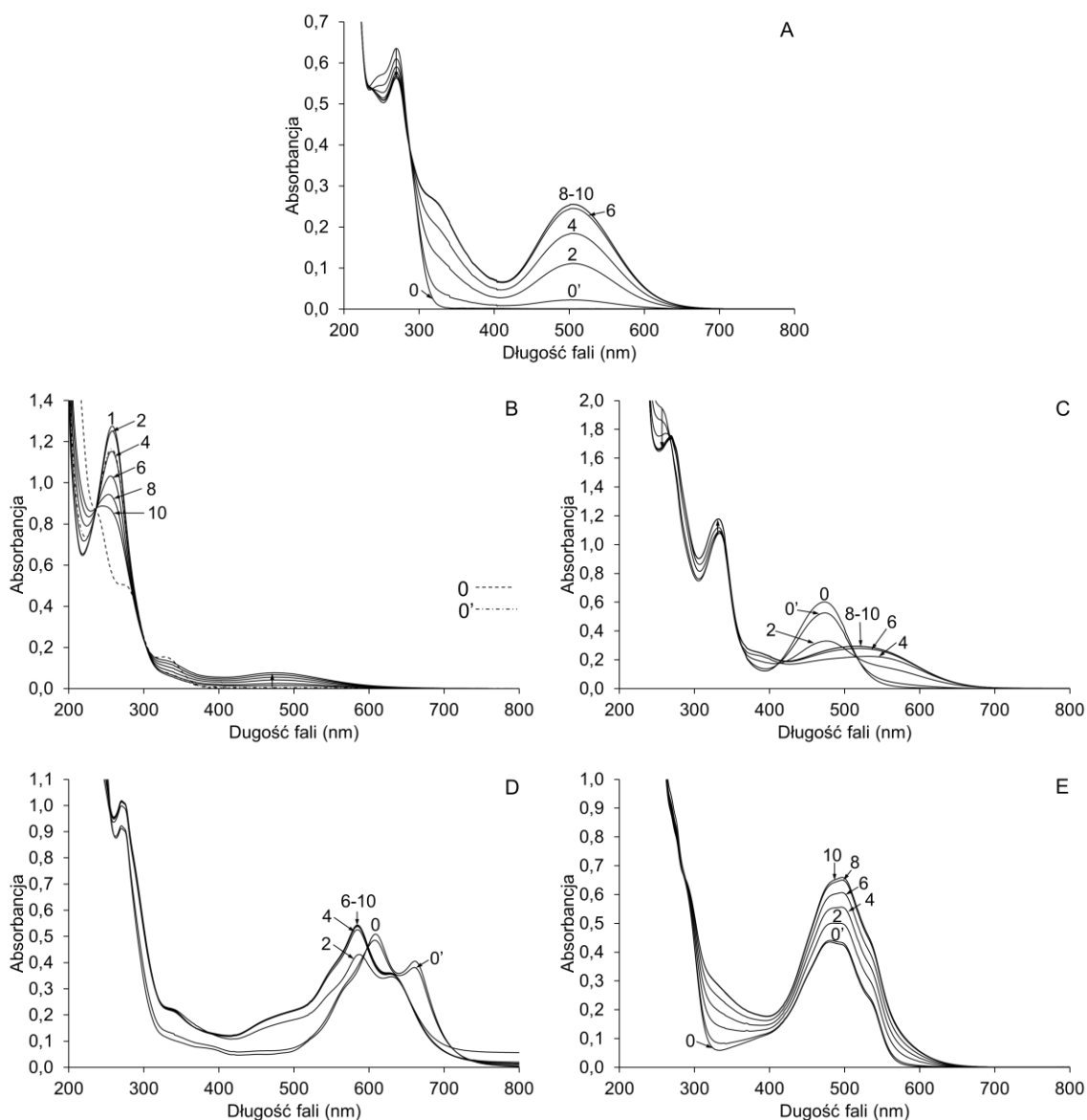
po przereagowaniu ryfampicyny. Maksimum absorpcji ryfampicyny w zakresie widzialnym przypada na 473 nm i w czasie reakcji Trindera w obecności tego związku obserwuje się gwałtowny spadek intensywności tego pasma, któremu towarzyszy pojawienie się szerokiego pasma z maksimum przy 530 nm (Rysunek 35C). Porównanie widm zarejestrowanych w czasie utlenienia ryfampicyny przez HRP (Rysunek 36B) i reakcji Trindera w obecności tego związku (Rysunek 35C) pozwala stwierdzić, że pasmo to jest wynikiem nałożenia się pasm absorpcji chromoforu reakcji Trindera (maksimum przy 505 nm) i produktu utlenienia ryfampicyny, który wykazuje maksimum absorpcji przy 550 nm [131]. Można więc założyć, że w reakcji Trindera utlenienie ryfampicyny i powstawanie chromoforu chinonoiminowego zachodzą równocześnie z porównywalnymi szybkościami. Znacznie szybszy spadek intensywności pasma absorpcji ryfampicyny w reakcji Trindera świadczy o tym, że w tym układzie związek ten jest utleniany głównie na drodze pośredniej przez rodnikowe produkty utlenienia fenolu i 4-aminoantypiryny.



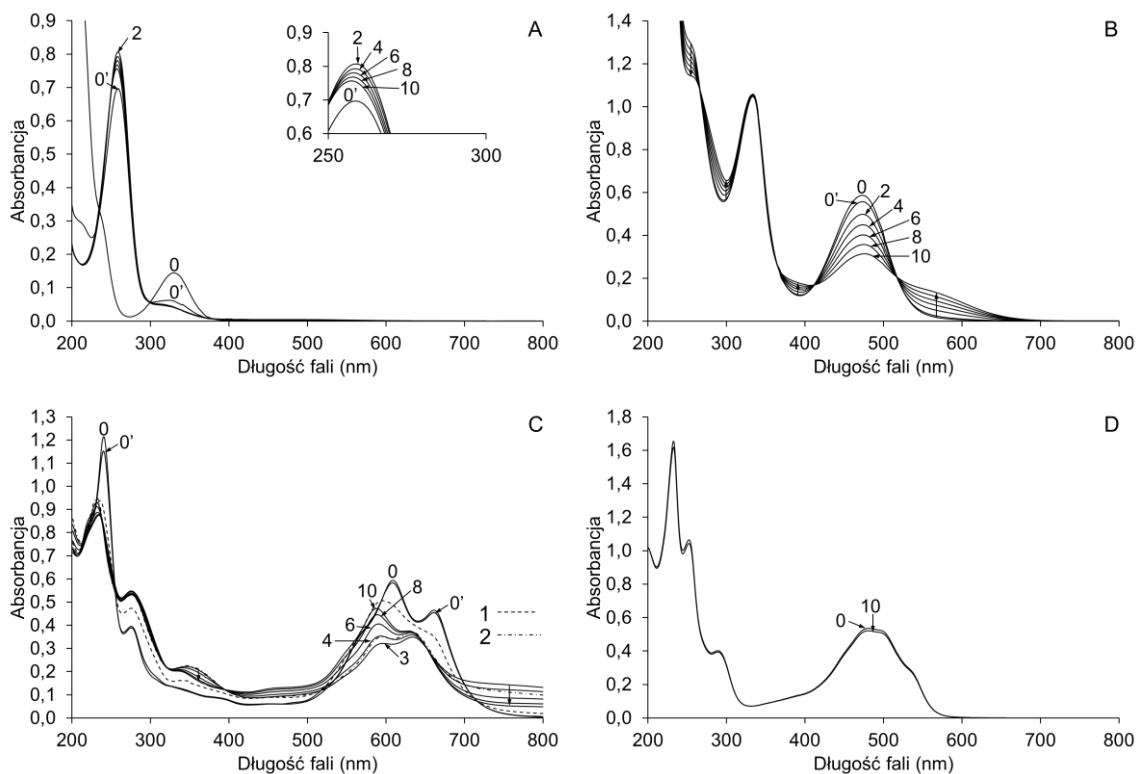
Rysunek 34. Wpływ leków z ugrupowaniem *p*-difenolowym na formowanie się chromoforu reakcji Trindera składającej się z 4-aminoantypiryny i fenolu. Mieszaniny reakcyjne składały się z 50 μM 4-aminoantypiryny, 100 μM fenolu, 50 μM H_2O_2 i 0,5 $\mu\text{g/ml}$ HRP bez badanych związków (0 μM), z mesalazyną (A), ryfampicyną (B), mitoksantronem (C) albo doksorubicyną (D) o stężeniu podanym przy każdej krzywej.

Obecność mitoksantronu ma niewielki wpływ na końcowe wartości absorbancji przy 505 nm, ale przyspiesza zmiany absorbancji w początkowej fazie reakcji (Rysunek 34C). Mitoksantron ma dwa maksima absorpcji w zakresie widzialnym przy 610 i 660 nm, które w trakcie reakcji jego utlenienia przez HRP ulegają przesunięciu hipsokromowemu do 590 i 630 nm, częściowo nakładając się na pasmo absorpcji chromoforu reakcji Trindera (Rysunek 36C). W czasie pomiarów absorbancji przy 505 nm obserwuje się więc sumowanie absorbancji tych dwóch produktów. Porównanie zmian widm zarejestrowanych w czasie utlenienia samego mitoksantronu przez HRP (Rysunek 36C) i reakcji Trindera w obecności tego związku (Rysunek 35D) pozwala stwierdzić, że, podobnie jak w przypadku ryfampicyny, w tym drugim układzie mitoksantron jest utleniany głównie na drodze pośredniej przez rodnikowe produkty utlenienia fenolu i 4-aminoantypiryny.

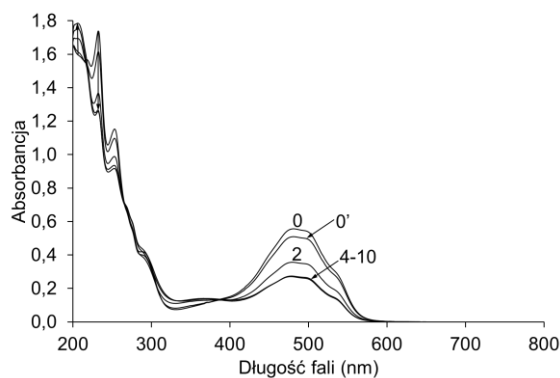
Obecność doksorubicyny powoduje zwiększenie wartości absorbancji w pomiarach przy 505 nm, ale wynika to jedynie z całkowitego nakładania się pasm absorpcji tego związku i chromoforu reakcji Trindera. Szybkości zmian absorbancji dla wszystkich zastosowanych stężeń tego leku są takie same, jak dla reakcji kontrolnej (Rysunek 34D). Dla mieszaniny doksorubicyny, nadtlenu wodoru i HRP nie zaobserwowano żadnych zmian widm, co świadczy o tym, że nie ulega ona utlenieniu enzymatycznemu. Ponieważ na podstawie widm zarejestrowanych w czasie reakcji Trindera w obecności doksorubicyny nie można było jednoznacznie stwierdzić, czy zaobserwowane zmiany są spowodowane powstawaniem chromoforu chinonoiminowego czy produktu pośredniego utlenienia doksorubicyny, przeprowadzono utlenienia mieszaniny doksorubicyny i fenolu. W tym układzie zaobserwowano gwałtowny spadek intensywności pasma absorpcji doksorubicyny (Rysunek 37). W reakcji Trindera przyrosty absorbancji są takie same dla reakcji kontrolnej i dla reakcji w obecności doksorubicyny, a więc można stwierdzić, że w tym układzie doksorubicyna nie ulega utlenieniu przez rodnik fenoksyloxy. W przeciwnym wypadku obserwowanoby mniejsze przyrosty a nawet spadek absorbancji (dla większych stężeń) w obecności tego leku. Szybkość utlenienia doksorubicyny przez rodnik fenoksyloxy musi więc być znacznie mniejsza od szybkości reakcji tego rodnika z 4-aminoantypiryną.



Rysunek 35. Wpływ leków z ugrupowaniem *p*-difenolowym na tworzenie się chromoforu reakcji Trindera składającej się z 4-aminoantypiryny i fenolu. Mieszanki reakcyjne składały się z 50 μM 4-aminoantypiryny, 100 μM fenolu, 50 μM H_2O_2 i 0,5 $\mu\text{g/ml}$ HRP bez badanych związków (A) lub w obecności 40 μM mesalazyny (B), 40 μM ryfampicyny (C), 40 μM mitoksantronu (D) albo 40 μM dokсорubicyny (E). Widma mieszanin reakcyjnych zarejestrowano przed dodaniem enzymu (0), od razu po dodaniu enzymu (0') i po czasie (w minutach) podanym przy każdej krzywej.



Rysunek 36. Utlenienie leków z ugrupowaniem *p*-difenolowym przez peroksydazę chrzanową. Mieszanki reakcyjne zawierały 50 μM H_2O_2 i 0,5 $\mu\text{g/ml}$ HRP oraz 40 μM mesalazyny (A), 40 μM ryfampicyny (B), 40 μM mitoksantronu (C) lub 50 μM doksorubicyny (D). Widma mieszanin reakcyjnych były zarejestrowane przed dodaniem enzymu (0), od razu po dodaniu enzymu (0') i po czasie (w minutach) podanym przy każdej krzywej.

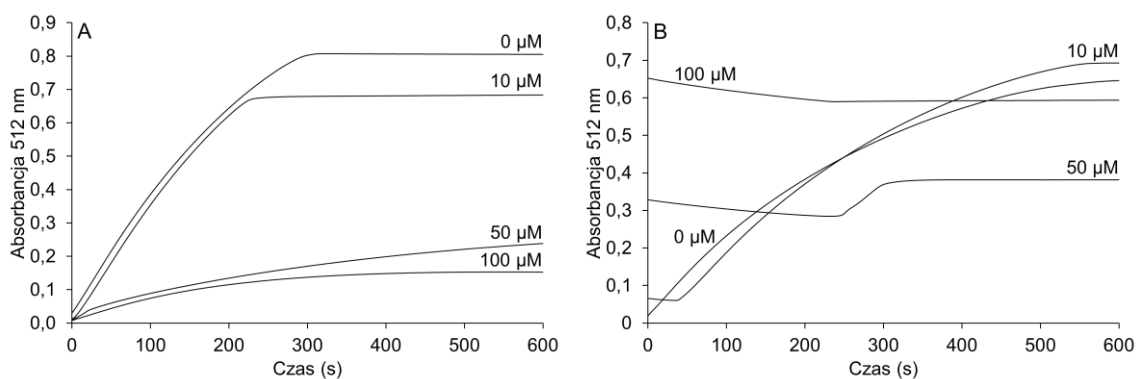


Rysunek 37. Utlenienie mieszaniny doksorubicyny i fenolu przez HRP. Mieszanka reakcyjna zawierała 50 μM doksorubicynę, 100 μM fenol, 50 μM H_2O_2 i 0,5 $\mu\text{g/ml}$ HRP. Widma zostały zarejestrowane przed dodaniem enzymu (0), od razu po dodaniu enzymu (0') i po czasie (w minutach) podanym przy każdej krzywej.

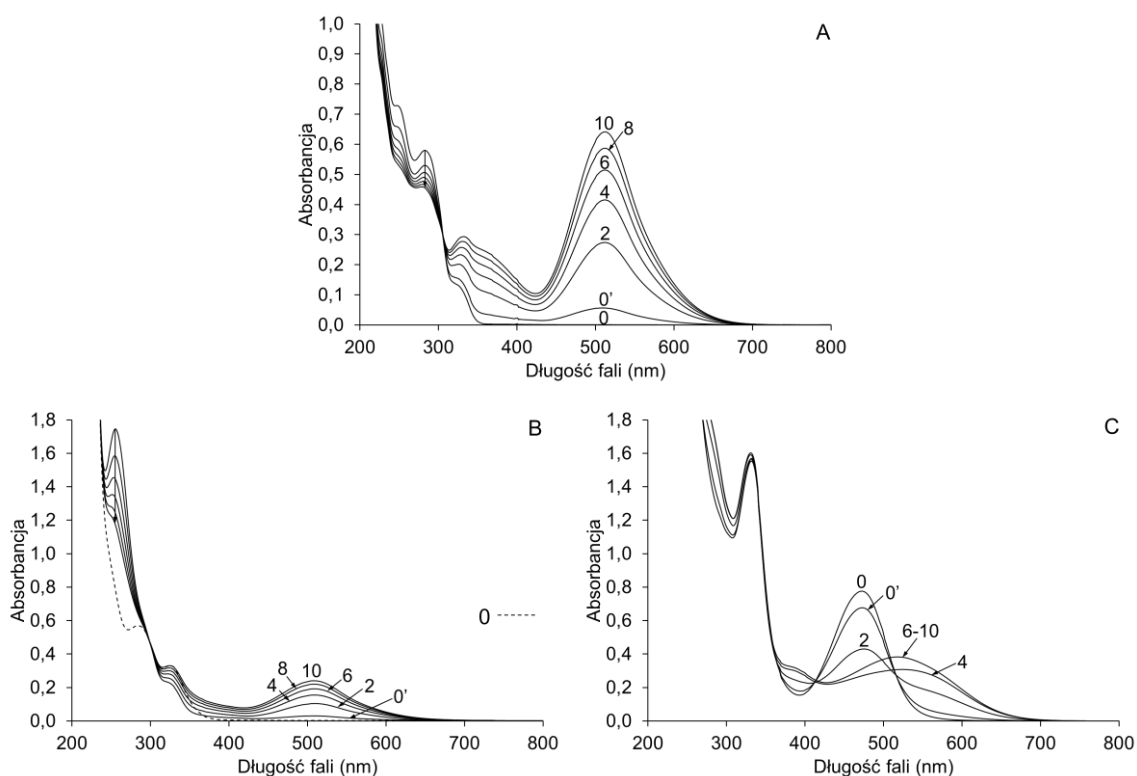
Dla mesalazyny i ryfampicyny dodatkowo sprawdzono ich wpływ na reakcję Trindera składającą się z DHBS i 4-aminoantypiryny. DHBS jest gorszym substratem HRP i generuje chromofor o większym współczynniku absorpcji niż fenol. Wpływ badanych związków na ten układ mógł więc być inny.

Dla mesalazyny efekt okazał się silniejszy (Rysunek 38A) niż w układzie z fenolem (Rysunek 34A) i należy to przypisać właśnie różnicy współczynników absorpcji chromoforów powstających w tych dwóch reakcjach. Porównanie widma dla reakcji Trindera w obecności mesalazyny w układach z fenolem (Rysunek 35B) i DHBS (Rysunek 39B) pozwala stwierdzić, że w obu przypadkach powstają chromofory antypirylochinonoiminowe, jednak obecność tego chromoforu jest bardziej widoczna w widmach reakcji z DHBS, ze względu na jego znacznie wyższy współczynnik absorpcji. Stąd też w widmach dla tej reakcji obserwuje się wyraźne maksimum przy 510 nm.

Dla ryfampicyny efekt był inny niż w układzie z fenolem i bardziej złożony. Jest to skutkiem działania trzech czynników: 1) nakładania się pasm absorpcji ryfampicyny, produktu jej utlenienia i chromoforów reakcji Trindera, 2) różnicy współczynników absorpcji chromoforów reakcji Trindera powstających w tych dwóch układach i 3) przesunięcia długości fali pomiaru w stronę maksimum absorpcji produktu utleniania ryfampicyny (z 505 do 512 nm). Dla stężenia ryfampicyny wynoszącego 10 μM obserwuje się więc końcową absorbancję nieco wyższą niż w reakcji kontrolnej, co jest wynikiem nakładania się pasm absorpcji ryfampicyny, produktu jej utlenienia i chromoforu reakcji Trindera. Dla stężenia ryfampicyny wynoszącego 50 μM końcowa absorbancja jest dużo niższa niż w reakcji kontrolnej, ponieważ powstający produkt utlenienia ryfampicyny ma dużo niższy współczynnik absorpcji przy tej długości fali. Dla stężenia ryfampicyny wynoszącego 100 μM końcowa absorbancja jest nieco niższa niż w reakcji kontrolnej, ponieważ znów jest ona wynikiem nakładania się pasm absorpcji ryfampicyny, produktu jej utlenienia i chromoforu reakcji Trindera, jednak w tym przypadku ten ostatni składnik, który ma największy współczynnik absorpcji przy tej długości fali, występuje w niewielkim stężeniu (Rysunek 38).



Rysunek 38. Wpływ leków z ugrupowaniem *p*-difenolowym na formowanie się chromoforu reakcji Trindera składającej się z 4-aminoantypiryny i DHBS. Mieszanki reakcyjne składały się z 50 μM 4-aminoantypiryny, 100 μM DHBS, 50 μM H₂O₂ i 3,0 μg/ml HRP bez badanych związków (0 μM), z mesalazyną (A) lub ryfampicyną (B) o stężeniu podanym przy każdej krzywej.



Rysunek 39. Wpływ leków z ugrupowaniem *p*-difenolowym na tworzenie się chromoforu reakcji Trindera składającej się z 4-aminoantypiryny i DHBS. Mieszanki reakcyjne składały się z 50 μM 4-aminoantypiryny, 100 μM DHBS, 50 μM H₂O₂ i 3,0 μg/ml HRP bez badanych związków (A) lub w obecności 50 μM mesalazyny (B) lub 50 μM ryfampicyny (C). Widma mieszanin reakcyjnych zarejestrowano przed dodaniem enzymu (0), od razu po dodaniu enzymu (0') i po czasie (w minutach) podanym przy każdej krzywej.

Aby można było w pełni zrozumieć jakie zmiany zachodzą w tych mieszaninach należałoby wykonać jeszcze dodatkowe eksperymenty, jednak ich potencjalny wpływ na reakcje Trindera obejmuje zakres stężeń od 10 do 100 μM . Maksymalne stężenie w plazmie pacjentów przyjmujących mesalazynę może wynieść jedynie 6 μM [132], ponieważ związek ten jest bardzo słabo wchłaniany do krwioobiegu [133]. Jednakże w przypadku ostrego uszkodzenia nerek u osób starszych może osiągnąć stężenie 32,6 μM , a takie stężenie jest już wystarczające aby obniżyć wyniki testów opartych na reakcji Trindera, co też miało miejsce w opisanym niedawno przypadku [103]. Ryfampicyna może osiągnąć w plazmie stężenie do 8 μM [134], co nie powinno istotnie zmieniać uzyskanych wyników. Mitoksantron w czasie 30 minut po infuzji może osiągnąć stężenie 12 μM , które mogłoby wpłynąć na uzyskane wyniki testów diagnostycznych, ale pobieranie próbek do analizy nie powinno mieć miejsca od razu po terapii, a więc stężenie, które może faktycznie wystąpić wynosi do 1 μM [135]. Takie stężenie nie będzie już miało żadnego znaczenia dla uzyskanych wyników testów diagnostycznych. Doksorubicyna nie wykazała wpływu na reakcję Trindera w zastosowanym zakresie stężeń, a jej stężenie w plazmie może wynieść do 1 μM , podobnie jak mitoksantronu. Pomimo tego, że przynajmniej 3 z 4 wymienionych w tym podrozdziale związków ma zdolność do zmiany wyników testów diagnostycznych opartych na reakcji Trindera, brak doniesień o ich wpływie na tego typu testy spowodowane jest tym, że w powszechnej praktyce leczniczej nie powinny one osiągnąć stężeń w płynach ustrojowych mogących spowodować takie zakłócenia.

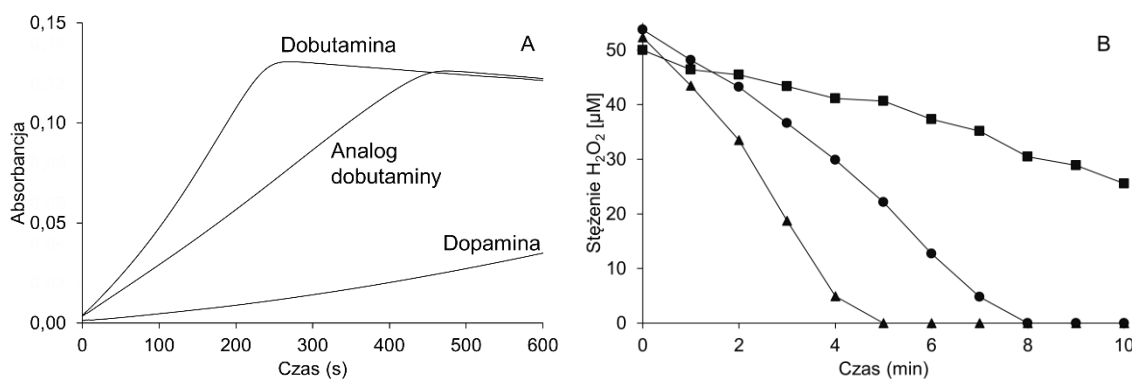
4.3. Utlenianie dopaminy, dobutaminy i jej metylowanego analogu przez peroksydazę chrzanową

W czasie badań zakłóceń enzymatycznych testów diagnostycznych przez dopaminę i dobutaminę stwierdzono, że utlenianie dobutaminy przez peroksydazę chrzanową jest znacznie szybsze niż dopaminy [78,107]. Zaproponowano wówczas dwa różne mechanizmy działania tych dwóch związków – uznano, że dobutamina działa jako konkurencyjny substrat prowadząc do wyczerpania nadtlenu wodoru, natomiast dopamina reaguje z produktem utlenienia 4-aminoantypiryny tworząc chromofor o znacznie mniejszym współczynniku absorpcji przy długości fali używanej do pomiaru absorbancji (505 nm) [78]. Jednak w reakcjach utlenienia obu związków zarejestrowano widma z pasmami absorpcji odpowiadającymi chromoforom typu aminochromów powstających w wyniku utlenienia ugrupowania katecholowego i ataku nukleofilowego grupy aminowej na powstały układ

o-chinonowy (addycja Michaela) oraz ponownej reakcji utlenienia powstałego produktu (leukoaminochromu, Rysunek 18). Zaproponowany mechanizm działania dopaminy wydawał się więc niezgodny z tymi wynikami. Dlatego też postanowiliśmy go zweryfikować przeprowadzając dokładną analizę utlenienia dopaminy i dobutaminy przez HRP.

Należy zauważyć, że dobutamina jest związkiem znacznie większym od dopaminy, zawierającym poza ugrupowaniem katecholowym również ugrupowanie fenolowe po przeciwnej stronie cząsteczki – układ 4-hydroksyfenyloizobutyłowy przyłączony do grupy aminowej łańcuchem alkilowym dłuższym o jeden atom węgla niż łańcuch alkilowy łączący grupę aminową i katecholową. Uznaliśmy więc, że ze względu na tę różnicę odległości grupa fenolowa może być utleniana szybciej niż grupa katecholowa, a następnie powstający rodnik fenoksyłowy może utleniać grupę katecholową. Takie pośrednie utleniania katecholi przez peroksydazy zostało już wcześniej opisane dla adrenaliny, której utlenienie przez HRP, MPO i LPO było przyspieszane w obecności substratów fenolowych, takich jak tyroksyna i jej pochodne [108,109]. Podobne zjawisko zaobserwowano dla L-dopy, której utlenianie przez LPO było stymulowane w obecności tyrozyny, a jej utlenienie przez peroksydazę z bobu (*Vicia faba*) było stymulowane w obecności kwasów hydroksycynamonowych [112] i ich estrów [113,136]. W odróżnieniu od tamtych systemów w cząsteczce dobutaminy obydwa ugrupowania – działające jako potencjalny przenośnik elektronów ugrupowanie fenolowe i działające jako końcowy donor elektronów ugrupowanie katecholowe znajdują się w jednej cząsteczce.

Aby sprawdzić udział ugrupowania fenolowego w utlenieniu ugrupowania katecholowego dobutaminy zsyntezowano analog dobutaminy z grupą fenolową zablokowaną przez metylację. Podejście to zostało już wykorzystane w przypadku tyroksyny i pokrewnych związków zawierających grupę fenolową przy badaniu ich wpływu na utlenienie adrenaliny [108]. Zablokowanie grupy fenolowej spowodowało znaczny spadek szybkości utlenienia grupy katecholowej, jednak utlenienie pochodnej dobutaminy nadal następowało szybciej niż utlenienie dopaminy (Rysunek 40). Szybkości utleniania wynosiły odpowiednio: 0,54 $\mu\text{M}/\text{min}$ dla dopaminy, 5,98 $\mu\text{M}/\text{min}$ dla metylowanej pochodnej dobutaminy i 10,20 $\mu\text{M}/\text{min}$ dla dobutaminy. Parametry kinetyczne reakcji utlenienia tych związków przez HRP znajdują się w tabeli 1. Wykresy Hanesa-Woolfa, które posłużyły do wyznaczenia tych parametrów,



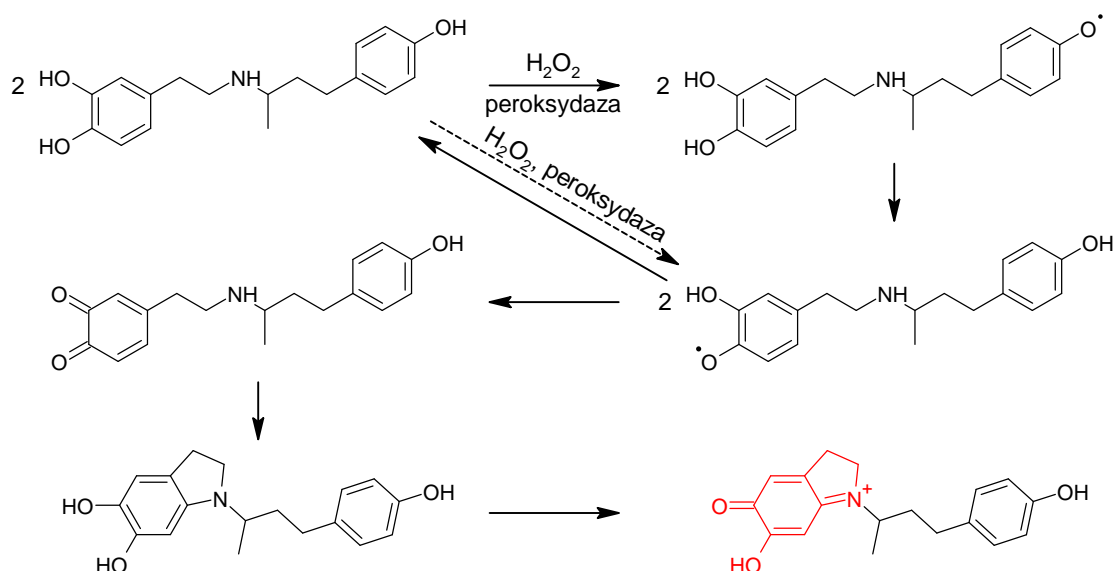
Rysunek 40. Pomiary absorbancji (A) i zużycia nadtlenu wodoru (B) w czasie reakcji utlenienia dopaminy (■), dobutaminy (▲) i metylowanego analogu dobutaminy (●). Mieszanki reakcyjne zawierały 50 µM badane związki, 50 µM H₂O₂ i 0,5 µg/ml HRP. Pomiary absorbancji wykonano przy 475 nm dla dopaminy, 485 nm dla dobutaminy i 486 nm dla metylowanej pochodnej dobutaminy.

przedstawione zostały na rysunku D5. Wyniki te wskazują na rolę grupy fenolowej dobutaminy jako pośrednika w przekazywaniu elektronów w ramach wewnątrzcząsteczkowej reakcji utlenienia. Proponowany mechanizm przedstawiony jest na rysunku 41. Szybsze utlenienie metylowanej pochodnej dobutaminy niż dopaminy pokazuje jednak, że duży podstawnik hydrofobowy przyłączony do grupy aminowej w cząsteczce dobutaminy ma duże znaczenie dla wiązania się tego związku do centrum katalitycznego HRP. Odzwierciedlają to wartości K_m tych reakcji.

Ponieważ z parametrów kinetycznych wynika, że oddziaływanie substratu z enzymem jest istotne dla szybkości utlenienia badanych związków, dla wyjaśnienia tych różnic przeprowadzono ich dokowanie molekularne do centrum aktywnego HRP. Do przygotowania modelu centrum aktywnego HRP posłużyła struktura krystaliczna związku I (PDB: 1HCH) [29]. Wyniki tych obliczeń pokazują, że dopamina jest wiązana w centrum katalitycznym w jednej dominującej pozycji (97,5% wszystkich dokowań). Pozycja ta przedstawiona jest na Rysunku 42. Widoczne jest zakotwiczenie grupy aminowej tej cząsteczki w pobliżu wejścia do centrum aktywnego w okolicy Ala136-Pro139. Ta część cząsteczki tworzy trzy wiązania wodorowe z atomami tlenu głównego łańcucha polipeptydowego enzymu. Grupa katecholowa jest skierowana do centrum aktywnego, a grupa fenolowa bliższa hemowi (4-OH) znajduje się w odległości 6,4 Å od żelaza hemowego. Zarówno dobutamina dostępna komercyjnie, jak i jej zsyntezowana pochodna są mieszaninami racemicznymi, dlatego przeprowadzono dokowanie

Tabela 1. Parametry kinetyczne reakcji utlenienia badanych związków przez peroksydazę chrzanową.

Związek	K_m (mM)	k_{cat} (1/min)	k_{cat}/K_m (1/(M×min))
Dopamina	9,06 ($\pm 0,67$)	$17,84 (\pm 0,66) \times 10^3$	$1,97 (\pm 0,12) \times 10^6$
Metylowana pochodna dobutaminy	1,80 ($\pm 0,12$)	$17,17 (\pm 0,60) \times 10^3$	$9,57 (\pm 0,28) \times 10^6$
Dobutamina	2,42 ($\pm 0,05$)	$38,37 (\pm 0,47) \times 10^3$	$15,89 (\pm 0,20) \times 10^6$



Rysunek 41. Mechanizm utlenienia dobutaminy przez peroksydazę chrzanową. W wyniku preferencyjnego utlenienia grupy fenolowej powstaje rodnik fenoksyłowy. Następnie dwa takie rodniki utleniają katechol do *o*-chinonu, najprawdopodobniej z wystąpieniem rodnika semichinonowego jako stanu pośredniego. Semichinon może również powstawać w bezpośredniej reakcji utlenienia ugrupowania katecholowego przez HRP (przerwana strzałka), jednak z szybkością mniejszą niż utlenienie ugrupowania fenolowego. W rezultacie reakcji dysproporcjonowania semichinonów odtwarzany jest substrat i powstaje amino-*o*-chinon, który ulega reakcji cyklizacji do leukoadrenochromu. Związek ten po utlenieniu przez rodnik i/lub *o*-chinon przekształca się w chromofor typu adrenochromu (czerwony).

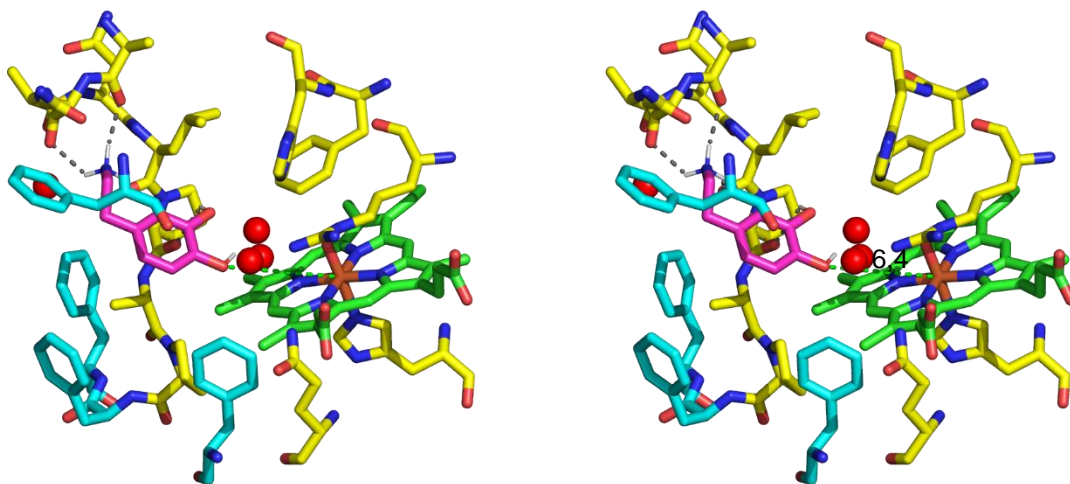
obu enancjomerów każdego związku. Wyniki tych obliczeń pokazują, że w przeciwieństwie do dopaminy oba związki wiążą się do enzymu w wielu pozycjach, co zostało przedstawione na rysunku D6. Wiązanie w pozycji z grupą katecholową skierowaną do hemu było tylko nieznacznie korzystniejsze niż położenie cząsteczki z grupą fenolową/metoksyfenylową skierowaną do hemu. Kilka sposobów wiązania liganda w centrum aktywnym HRP jest możliwe, na co wskazuje chociażby struktura krystaliczna enzymu z kwasem ferulowym [31] (Rysunek 5). Wyniki dokowania obu enancjomerów dobutaminy są bardzo podobne. Przedstawione są one na Rysunkach 43i 44. Dobutamina w pozycji skierowanej grupą

fenolową do hemu tworzy wiązanie wodorowe między atomem tlenu grupy fenolowej a pierścieniem imidazolowym His42. Odległość między tlenem grupy fenolowej w tej pozycji a żelazem hemowym wynosi 4,0 Å. Reszta katecholowa znajduje się natomiast w zagłębieniu tworzonym przez łańcuch główny reszt Ala136-Pro139, tworząc wiązanie wodorowe z jednym z atomów tlenu głównego łańcucha białka. W pozycji z grupą katecholową skierowaną do hemu grupa fenolowa 4-OH tworzy wiązanie wodorowe z tlenem Gly69 a grupa fenolowa 3-OH wiązanie wodorowe z łańcuchem bocznym Arg38. Odległość między tlenem bliższej grupy fenolowej (4-OH) a żelazem hemowym wynosi 6,4 Å. Te różnice w odległościach między grupami podatnymi na utlenienie a żelazem hemowym wyjaśniają, zgodnie z równaniem Marcusa [137,138], większą szybkość utlenienia grupy fenolowej niż grupy katecholowej dobutaminy. Wyniki dla metylowanej pochodnej dobutaminy są bardzo podobne, jak dla dobutaminy – pozycje o najniższych energiach wiązania przedstawione są na Rysunkach 45i 46. Wyniki dokowania wszystkich trzech związków zostały podsumowane w Tabeli 2.

Tabela 2. Podsumowanie wyników dokowania molekularnego. Uwzględniono tylko klastry zawierające 5 lub więcej pozycji.

Związek	Grupa funkcyjna skierowana do centrum aktywnego	Liczba klastrów	Udział klastrów we wszystkich wynikach	Energia wiązania dla pozycji o najniższej energii (kcal/mol)	Odległość pomiędzy 4-OH/4-OMe a żelazem hemowym dla pozycji o najniższej energii
Dopamina	katecholowa	1	97,5%	-8,34	6,4 Å
<i>R</i> -Dobutamina	katecholowa	4	40%	-9,84	6,4 Å
	fenolowa	2	27%	-9,08	4,0 Å
<i>S</i> -Dobutamina	katecholowa	4	43%	-11,13	6,0 Å
	fenolowa	2	18,5%	-9,94	4,0 Å
Metylowany analog <i>R</i> -dobutaminy	katecholowa	5	35%	-9,11	6,1 Å
	metoksylowa	3	29%	-9,21	4,1 Å
Metylowany analog <i>S</i> -dobutaminy	katecholowa	7	28%	-9,13	6,4 Å
	metoksylowa	3	20,5%	-10,06	4,4 Å

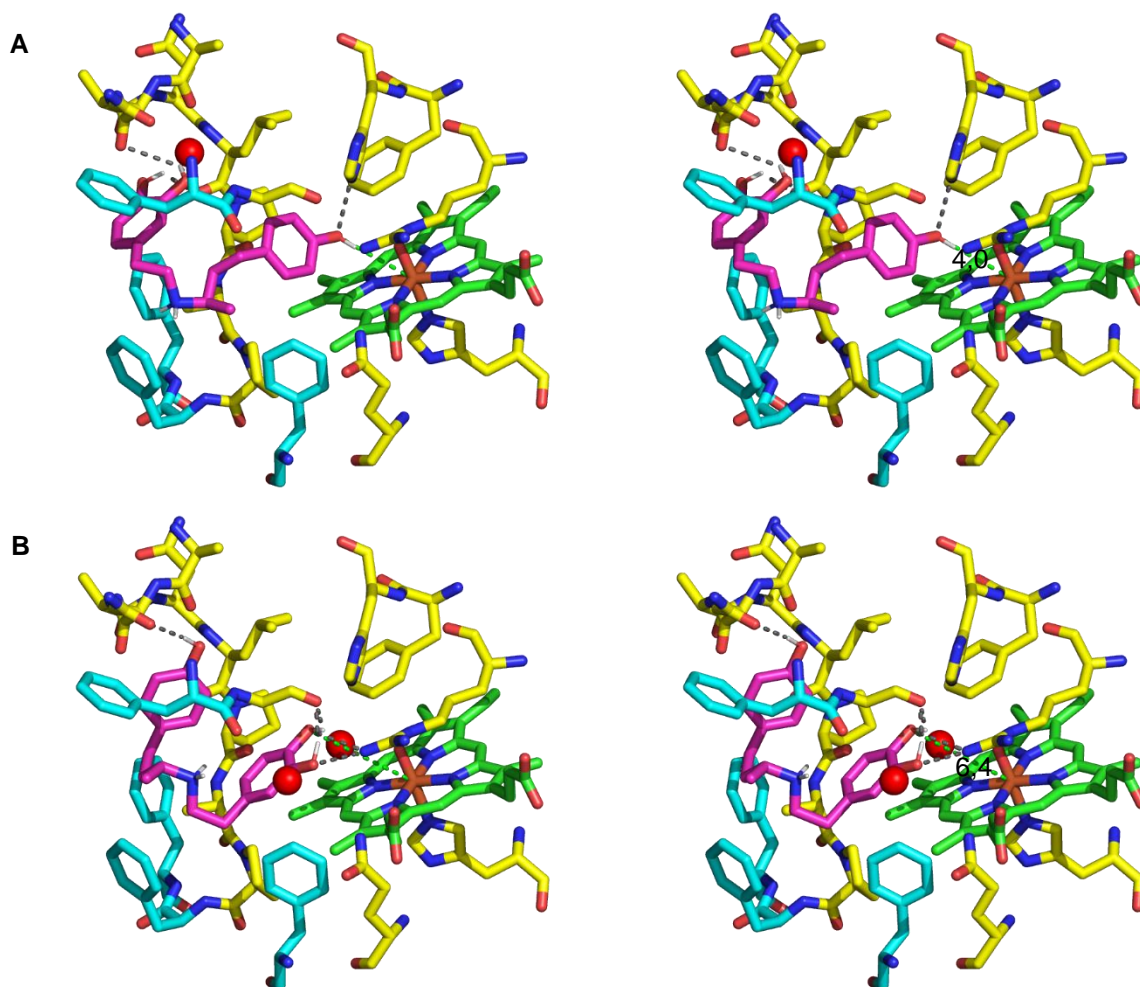
Uzyskane wyniki pozwalają na wyjaśnienie różnic w szybkości utlenienia alkilokatecholi, opisanych poprzednio w literaturze [74]. Już wcześniej postulowano, że różnice w szybkościach utleniania substratów przez związek I oraz związek II wynikają z odległości grupy redukcyjnej od centrum katalitycznego HRP [137,138]. Zgodnie z równaniem Marcusa, różnica odległości wynosząca 1 Å powoduje 33-krotną różnicę w szybkości reakcji. Dlatego dla związków o zbliżonych właściwościach elektrochemicznych



Rysunek 42. Wyniki dokowania molekularnego dopaminy do centrum aktywnego HRP [PDB: 1HCH]. Grupa hemowa zaznaczona na zielono, reszty aminokwasów centrum aktywnego zaznaczone na żółto, reszty fenyloalanin wejścia do centrum aktywnego zaznaczone kolorem cyjan, a dopamina zaznaczona magentą. Czerwone kule przedstawiają położenie cząsteczek wody. Szare przerywane linie przedstawiają oddziaływania wodorowe. Zielona przerywana linia przedstawia odległość pomiędzy żelazem hemowym i tlenem bliższej grupy fenolowej (4-OH). Obraz stereoskopowy przedstawiony techniką krzyżogłędu.

właśnie charakter przestrzenny i oddziaływania polarno-hydrofobowe będą decydować o szybkości reakcji. Związki o rozbudowanym i/lub polarnym podstawniku będą miały utrudniony dostęp do centrum katalicznego, przez co odległość do centrum reakcyjnego będzie większa, a szybkość reakcji mniejsza [15]. Dokowanie molekularne wykazało, że wnęka Ala136-Pro139 zdolna jest do wiązania substratów posiadających grupy będące donorami wiązania wodorowego. Takie zakotwiczenie substratów o krótkich łańcuchach alkilowych między grupą tworzącą takie oddziaływania a grupą redukcyjną uniemożliwia ich dostęp do głębszych części centrum aktywnego. Natomiast związki posiadające ugrupowania niezdolne do tworzenia wiązań wodorowych jako donor mają dostęp do samego centrum katalicznego, dzięki czemu są utleniane znacznie szybciej.

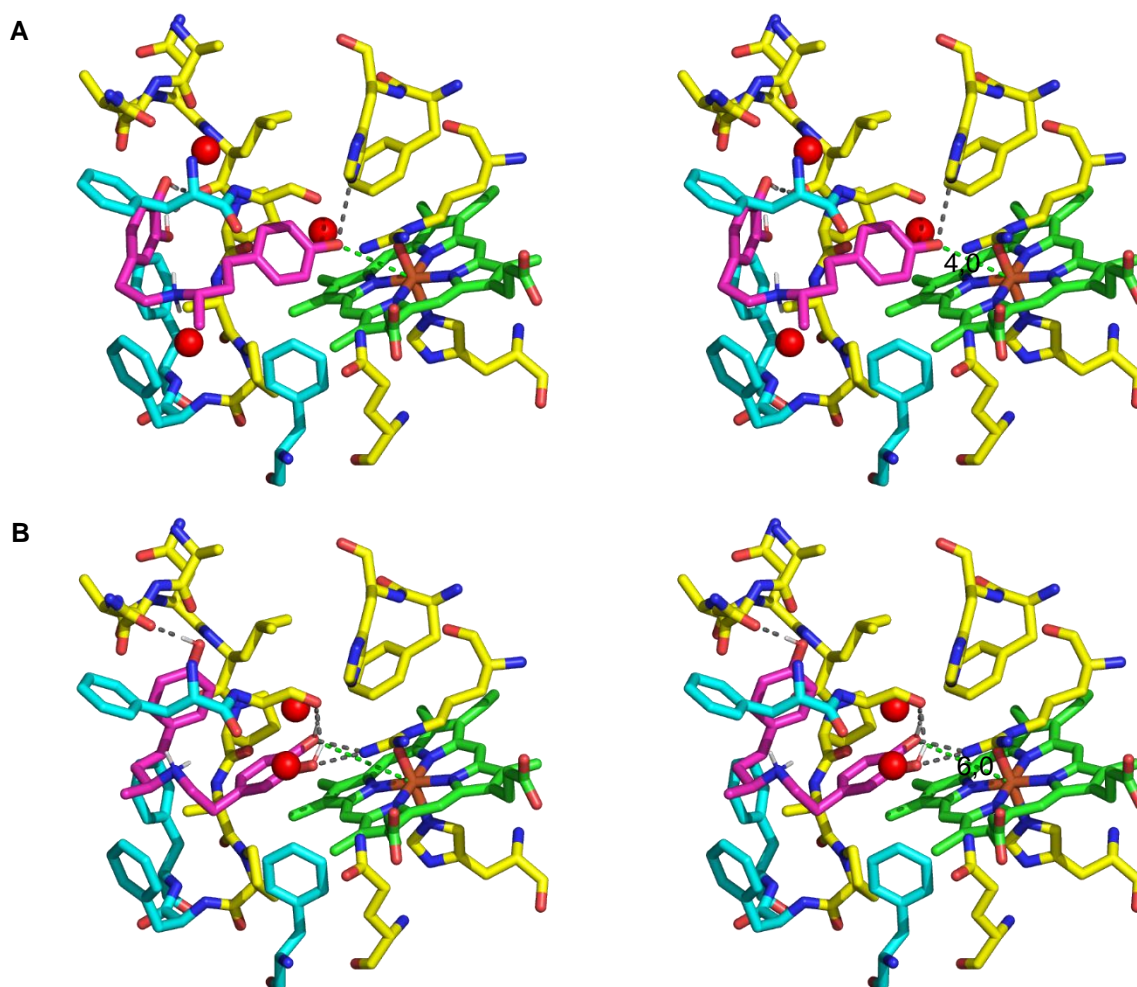
Wyniki dokowania molekularnego tłumaczą różnice w parametrach kinetycznych dla reakcji utlenienia dopaminy, *N*-metylodopaminy i *N*-acetylodopaminy przez HRP opisane wcześniej w literaturze [74]. Wartości k_{cat} dla tych reakcji wynoszą odpowiednio 447, 452 i 1800 1/s, a wartości K_m odpowiednio 16,8, 20,6, i 1,4 mM [74]. Acetylacja grupy aminowej dopaminy skutkująca powstaniem cząsteczki pozbawionej ładunku oraz dwóch protonów na atomie azotu względem cząsteczki macierzystej, powoduje wzrost stałej katalicznej i zmniejszenie się stałej Michaelisa. Natomiast metylacja grupy aminowej dopaminy usuwa



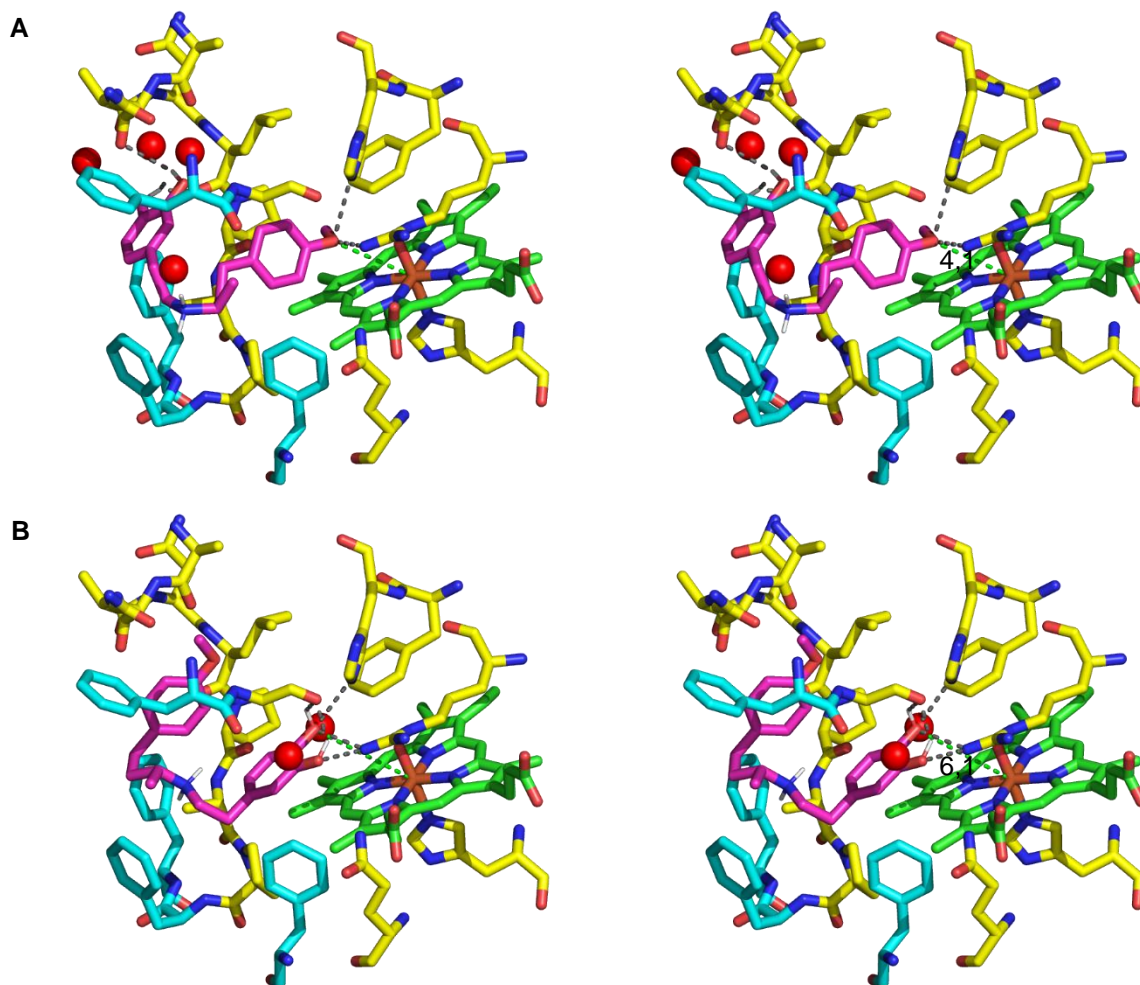
Rysunek 43. Wyniki dokowania molekularnego *R*-dobutaminy do centrum aktywnego HRP [PDB: 1HCH]. Dobutamina skierowana grupą fenolową (A) oraz skierowana grupa katecholową do centrum aktywnego (B). Grupa hemowa zaznaczona na zielono, reszty aminokwasów centrum aktywnego zaznaczone na żółto, reszty fenyloalanin wejścia do centrum aktywnego zaznaczone kolorem cyjan, a *R*-dobutamina zaznaczona magentą. Czerwone kule przedstawiają położenie cząsteczek wody. Szare przerywane linie przedstawiają oddziaływania wodorowe. Zielona przerywana linia przedstawia odległość pomiędzy żelazem hemowym i tlenem bliższej grupy fenolowej (4-OH). Obraz stereoskopowy przedstawiony techniką krzyżogłędu.

jeden proton, nie zmieniając ładunku tej grupy, co przekłada się na mało istotne różnice w parametrach kinetycznych względem dopaminy. Natomiast wpływ długości łańcucha pomiędzy grupą katecholową a obdarzoną ładunkiem grupą dobrze reprezentuje różnica stałych katalitycznych dla reakcji utlenienia kwasu 3,4-dihydroksyfenylooctowego i kwasu 3,4-dihydroksyfenylopropionowego – ponad trzykrotnie większa stała szybkości dla związku z łańcuchem węglowym dłuższym o jeden atom (odpowiednio 469 i 1558 1/s) [74]. Długość łańcucha węglowego pomiędzy grupą aminową a pierścieniem aromatycznym ma również znaczenie dla wiązania się inhibitorów mieloperoksydazy – pochodnych 3-aminoalkiloindolu.

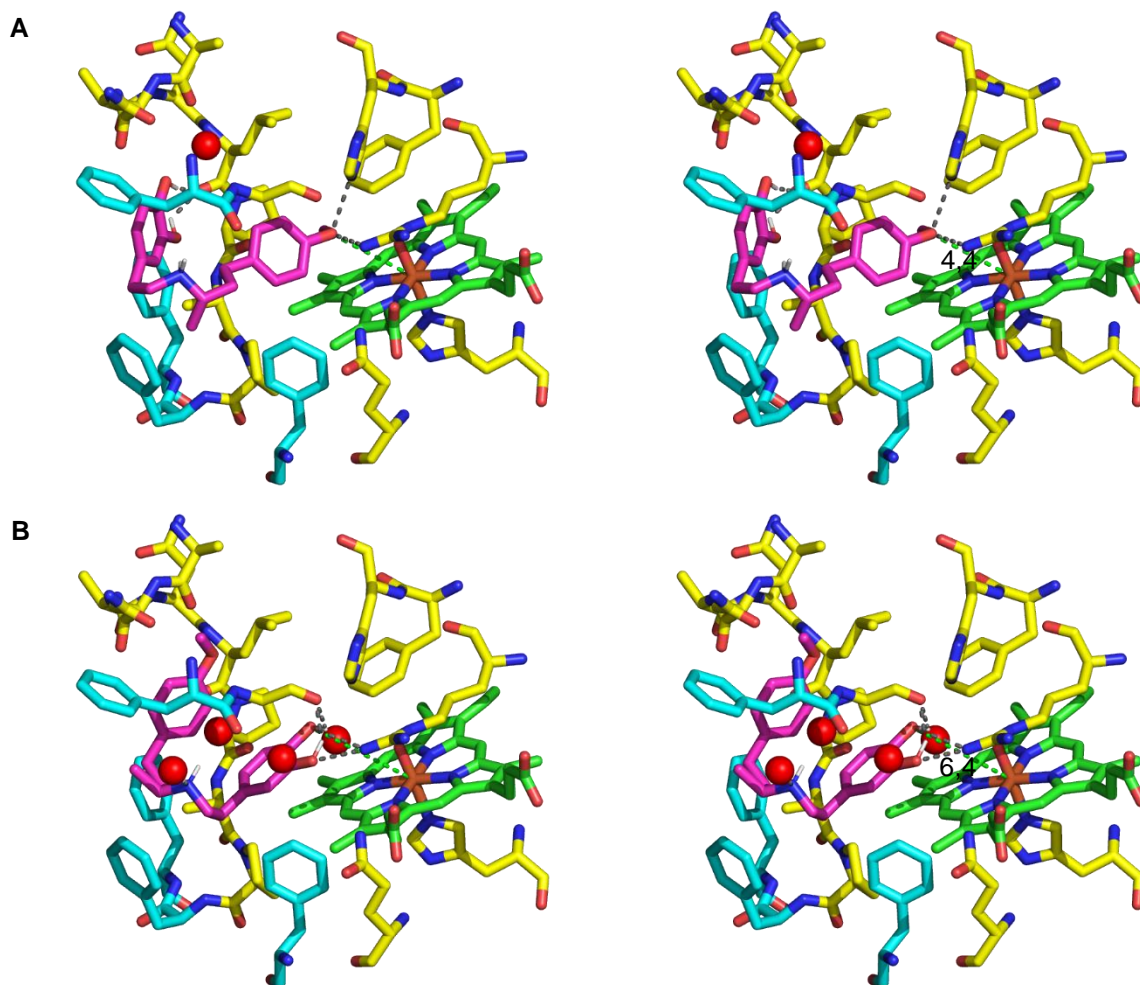
Pochodne zawierające jednoatomowy łańcuch węglowy nie wykazywały właściwości inhibitorowych ale związki z cztero- czy pięciowęglowym łącznikiem były silniejszymi inhibitorami [139,140].



Rysunek 44. Wyniki dokowania molekularnego *S*-dobutaminy do centrum aktywnego HRP [PDB: 1HCH]. Dobutamina skierowana grupą fenolową (A) oraz skierowana grupa katecholową do centrum aktywnego (B). Grupa hemowa zaznaczona na zielono, reszty aminokwasów centrum aktywnego zaznaczone na żółto, reszty fenyloalanin wejścia do centrum aktywnego zaznaczone kolorem cyjan, a *S*-dobutamina zaznaczona magentą. Czerwone kule przedstawiają położenie cząsteczek wody. Szare przerywane linie przedstawiają oddziaływania wodorowe. Zielona przerywana linia przedstawia odległość pomiędzy żelazem hemowym i tlenem bliższej grupy fenolowej (4-OH). Obraz stereoskopowy przedstawiony techniką krzyżogładu.



Rysunek 45. Wyniki dokowania molekularnego metylowanej pochodnej *R*-dobutaminy do centrum aktywnego HRP [PDB: 1HCH]. Metylowana pochodna dobutaminy skierowana grupą metoksyową (A) oraz skierowana grupa katecholową do centrum aktywnego (B). Grupa hemowa zaznaczona na zielono, reszty aminokwasów centrum aktywnego zaznaczone na żółto, reszty fenyloalanin wejścia do centrum aktywnego zaznaczone kolorem cyjan, a metylowana pochodna *R*-dobutaminy zaznaczona magentą. Czerwone kule przedstawiają położenie cząsteczek wody. Szare przerywane linie przedstawiają oddziaływania wodorowe. Zielona przerywana linia przedstawia odległość pomiędzy żelazem hemowym i tlenem bliższej grupy fenolowej (4-OH). Obraz stereoskopowy przedstawiony techniką krzyżogłądu.

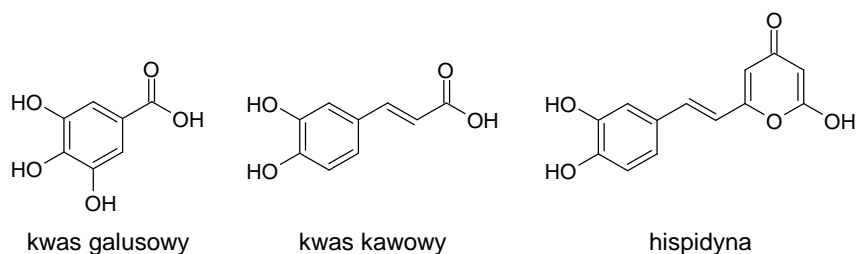


Rysunek 46. Wyniki dokowania molekularnego metylowanej pochodnej *S*-dobutaminy do centrum aktywnego HRP [PDB: 1HCH]. Metylowana pochodna dobutaminy skierowana grupą metoksyłową (A) oraz skierowana grupa katecholową do centrum aktywnego (B). Grupa hemowa zaznaczona na zielono, reszty aminokwasów centrum aktywnego zaznaczone na żółto, reszty fenyloalanin wejścia do centrum aktywnego zaznaczone kolorem cyjan, a metylowana pochodna *S*-dobutaminy zaznaczona magentą. Czerwone kule przedstawiają położenie cząsteczek wody. Szare przerywane linie przedstawiają oddziaływania wodorowe. Zielona przerywana linia przedstawia odległość pomiędzy żelazem hemowym i tlenem bliższej grupy fenolowej (4-OH). Obraz stereoskopowy przedstawiony techniką krzyżogłądu.

4.4. Reakcje z kwasem galusowym, kwasem kawowym i hispidyną

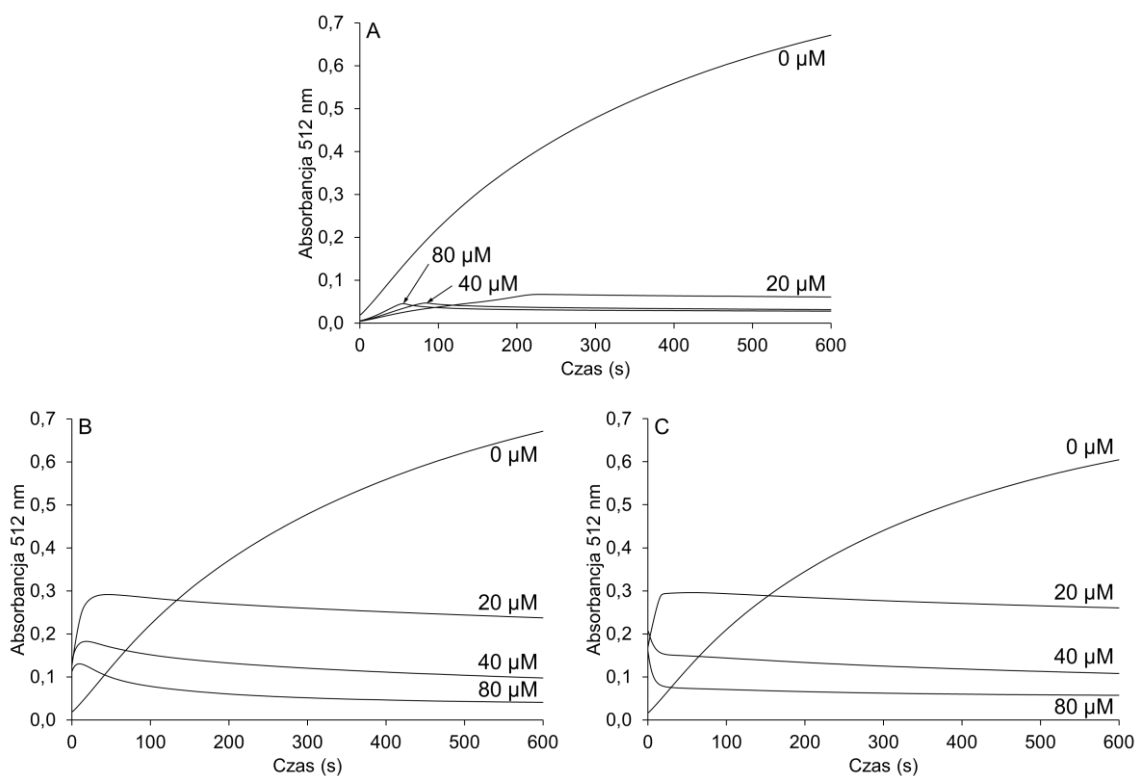
Hispidyna jest związkiem naturalnym występującym w błyskoporku szczotkowanym (*Inonotus hispidus*), który stosowany jest w medycynie ludowej m.in. do leczenia wrzodów żołądka [115]. Związek ten razem z kwasem galusowym zostały opisane jako inhibitory HRP na podstawie wyników zahamowania przyrostów absorbancji w teście do oznaczenia kwasu moczowego [115]. W teście tym stosowana jest reakcja Trindera z DHBS-em jako substratem. Jednakże kwas galusowy, podobnie jak inne związki zawierające układ pirogallolowy, jest znanym substratem HRP [141]. Struktura hispidyny natomiast jest podobna do kwasu

kawowego – zawiera ten sam układ katecholowy, a grupa karboksylowa jest zastąpiona układem 2-hydroksy-4-piranonu. Kwas kawowy zaś, podobnie jak inne kwasy hydroksycynamonowe, jest znanym od dekad substratem peroksydaz [142]. Struktury tych trzech związków przedstawione są na Rysunku 47. Już w czasie, gdy test do oznaczania kwasu moczowego został opracowany, wykryto, że związki z układem katecholowym, takie jak L-dopa, α -metylodopa i kwas 3,4-dihydroksyfenylooctowy, powodują jego zakłócenia, obniżając wartość absorbancji [62]. Mechanizmy tych zakłóceń mogły być takie same jak w przypadku karbidopy, dopaminy, kwasu 3,4-dihydroksyfenylooctowego i kwasu 3,4-dihydroksy-fenylopropionowego w reakcji utlenienia fenolu i 4-aminoantypiryny przez HRP [83]. Wydawało się więc mało prawdopodobne, że kwas galusowy i hispidyna są inhibitorami peroksydazy chrzanowej, a w zastosowanym teście enzymatycznym są raczej jej alternatywnymi substratami lub działają jako przeciwutleniacze redukujące rodnikowe produkty reakcji Trindera. Zdecydowaliśmy się więc wykonać dokładną analizę tej reakcji w obecności tych związków w celu weryfikacji tych wyników. Po konsultacji z redaktorem naczelnym Journal of Biomolecular Structure and Dynamics badania te zostały przeprowadzone we współpracy z autorami artykułu, w którym zostały one opisane.



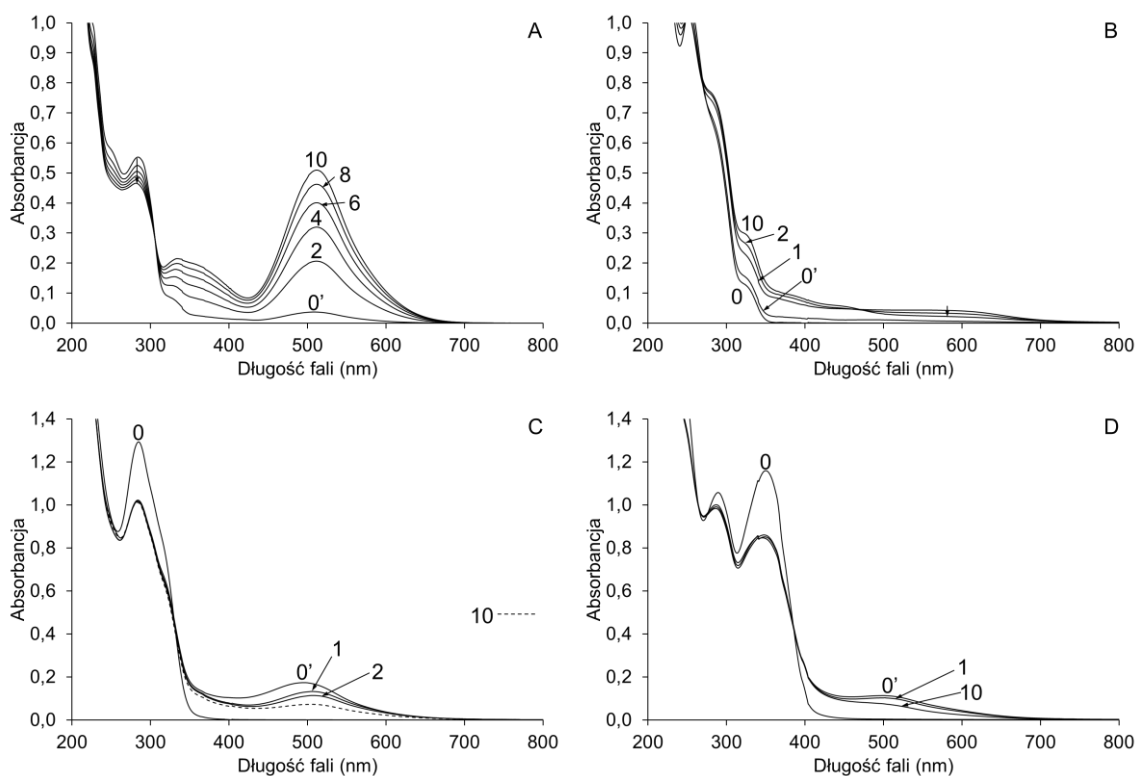
Rysunek 47. Struktury kwasu galusowego, kwasu kawowego i hispidyny.

Pomiary absorbancji przy 512 nm (długość fali odpowiadającej maksimum absorpcji chromoforu reakcji Trindera, Rysunek 48) i widma zarejestrowane w czasie reakcji Trindera składającej się z DHBS i 4-aminoantypiryny bez badanych związków oraz w obecności 50 μ M kwasu galusowego, 50 μ M kwasu kawowego lub 50 μ M hispidyny (Rysunek 49) pokazują zahamowanie przyrostów absorbancji w paśmie chromoforu chinonoiminowego. W widmach można dodatkowo zauważyć znaczny spadek absorbancji przy około 300 nm dla reakcji z kwasem kawowym i 370 nm dla reakcji z hispidyną. Ponieważ te zakresy odpowiadają pasmom absorpcji tych związków, takie zmiany w widmach świadczyły o ich utlenieniu.



Rysunek 48. Wpływ badanych związków na formowanie się chromoforu reakcji Trindera składającej się z 4-aminoantypiryny i DHBS. Mieszanki reakcyjne zawierały 50 μM 4-aminoantypiryny, 100 μM DHBS, 50 μM H_2O_2 i 3,0 $\mu\text{g/ml}$ HRP bez badanych związków (0 μM), kwas galusowy (A), kwas kawowy (B) albo hispidynę (C) o stężeniu podanym przy każdej krzywej.

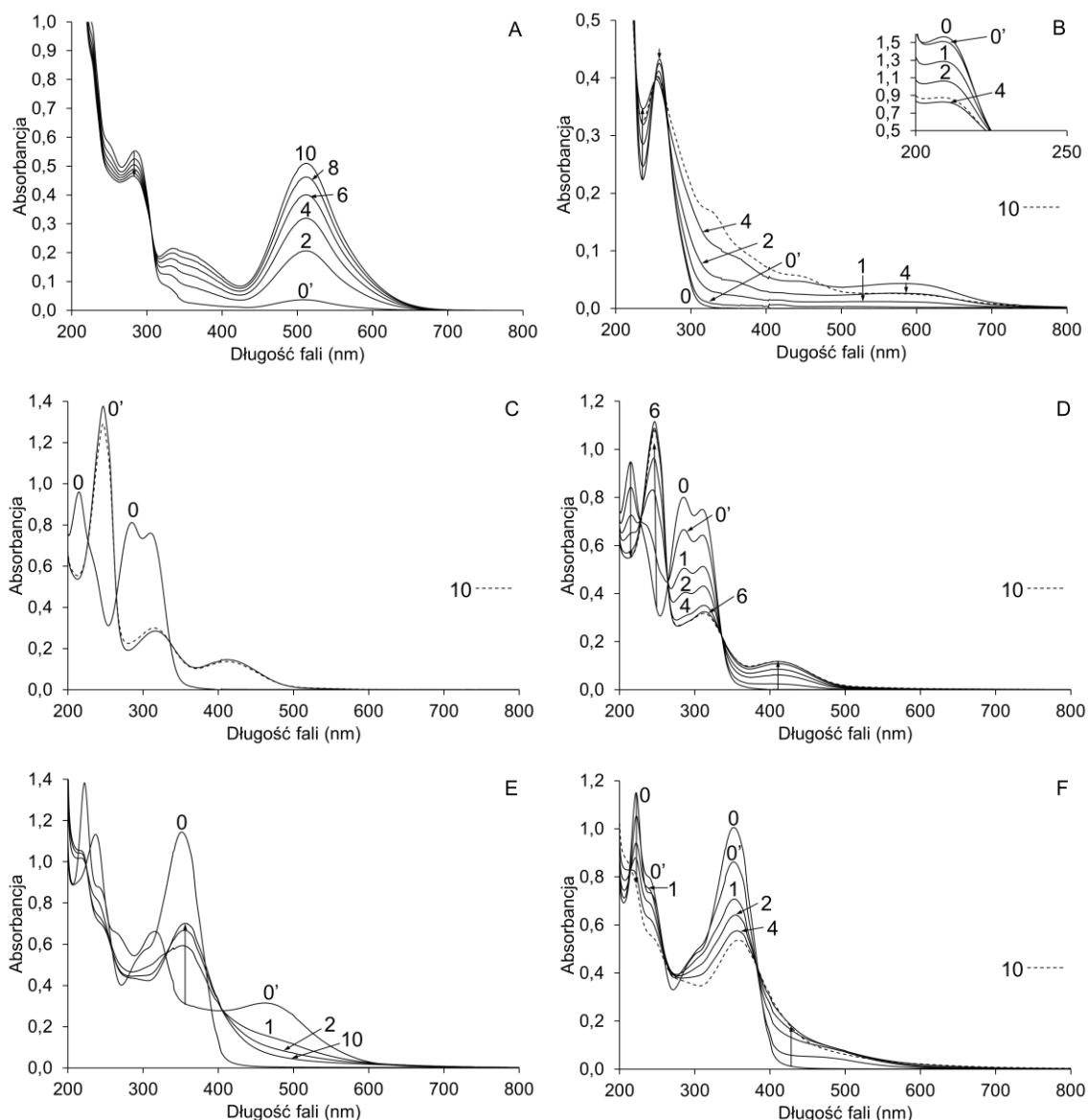
Przeprowadzono zatem pomiary widm dla reakcji utlenienia samych związków badanych przez HRP (Rysunek 50). Wyniki tych eksperymentów potwierdziły, że w zastosowanych warunkach wszystkie trzy związki były utleniane przez HRP, a w przypadku kwasu kawowego i hispidyny reakcje po dodaniu enzymu zachodziły błyskawicznie. Kwas galusowy jest utleniany przez HRP do produktów o szerokim paśmie absorpcji w zakresie widzialnym, co świadczy o tym, że powstaje mieszanina produktów, najprawdopodobniej o charakterze oligomerycznym lub polimerycznym. W wyniku utlenienia kwasu kawowego przez HRP powstaje *o*-chinon o maksimum absorpcji przy 412 nm. Utlenienie hispidyny przez HRP nie zostało jeszcze opisane. Związek ten jest błyskawicznie utleniany przez HRP, a powstający produkt wykazuje maksimum absorpcji przy około 460 nm, ale ulega szybkiemu rozpadowi. Maksimum absorpcji bezpośredniego produktu utlenienia hispidyny odpowiada typowemu zakresowi absorpcji *o*-chinonów przesuniętemu batochromowo (zazwyczaj maksimum absorpcji *o*-chinonów przypada na około 400 nm) [143]. To przesunięcie spowodowane jest



Rysunek 49. Wpływ badanych związków na powstawanie chromoforu reakcji Trindera składającej się z 4-aminoantypiryny i DHBS. Mieszanki reakcyjne zawierały 50 μM 4-aminoantypirynę, 100 μM DHBS, 50 μM H_2O_2 i 3,0 $\mu\text{g/ml}$ HRP bez badanych związków (A), 50 μM kwas galusowy (B), 50 μM kwas kawowy (C) albo 50 μM hispidynę (D). Widma mieszanin reakcyjnych były zarejestrowane przed dodaniem enzymu (0), od razu po dodaniu enzymu (0') i po czasie (w minutach) podanym przy każdej krzywej.

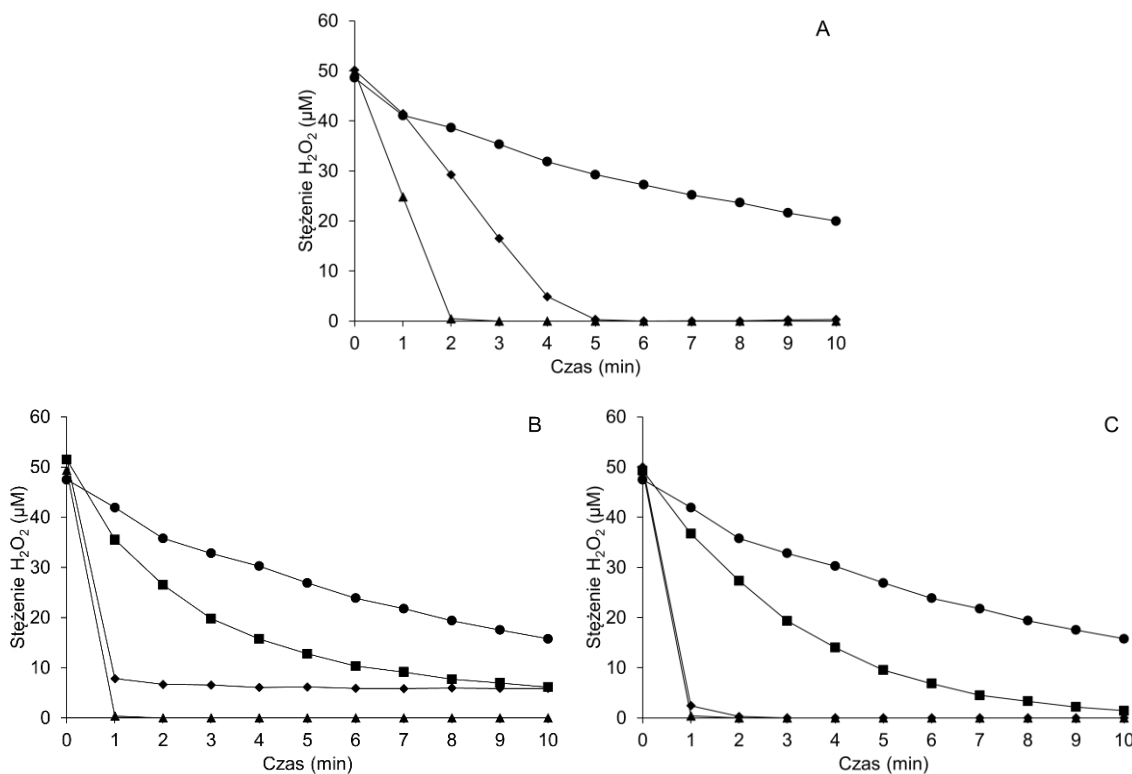
obecnością w cząsteczce pierścienia 2-hydroksy-4-piranonowego. Dopiero zmniejszenie ilości enzymu 60-krotnie dla reakcji z kwasem kawowym i 100-krotnie dla reakcji z hispidyną dało szybkości reakcji zbliżone do szybkości utlenienia DHBS. Pasma absorpcji przy 460 nm nie obserwuje się w reakcji z hispidyną ze 100-krotnie zmniejszoną ilością enzymu, co wskazuje, że produkt utlenienia tego związku rozpada się przynajmniej tak szybko jak powstaje.

Nadtlenek wodoru był znacznie szybciej zużywany w reakcjach Trindera zawierających badane związki i reakcjach utlenienia samych badanych związków aniżeli w reakcji kontrolnej (Rysunek 51). W reakcji z samym kwasem galusowym zużycie całego nadtlenku wodoru następowało w ciągu 5 minut, a w mieszaninie z substratami reakcji Trindera nadtlenek wodoru został zużyty w ciągu 2 minut. Możliwe, że poza bezpośrednim utlenieniem przez HRP związek ten redukuje również rodnikowe produkty pośrednie reakcji Trindera, które powstają w tym układzie. Dla reakcji utlenienia kwasu kawowego



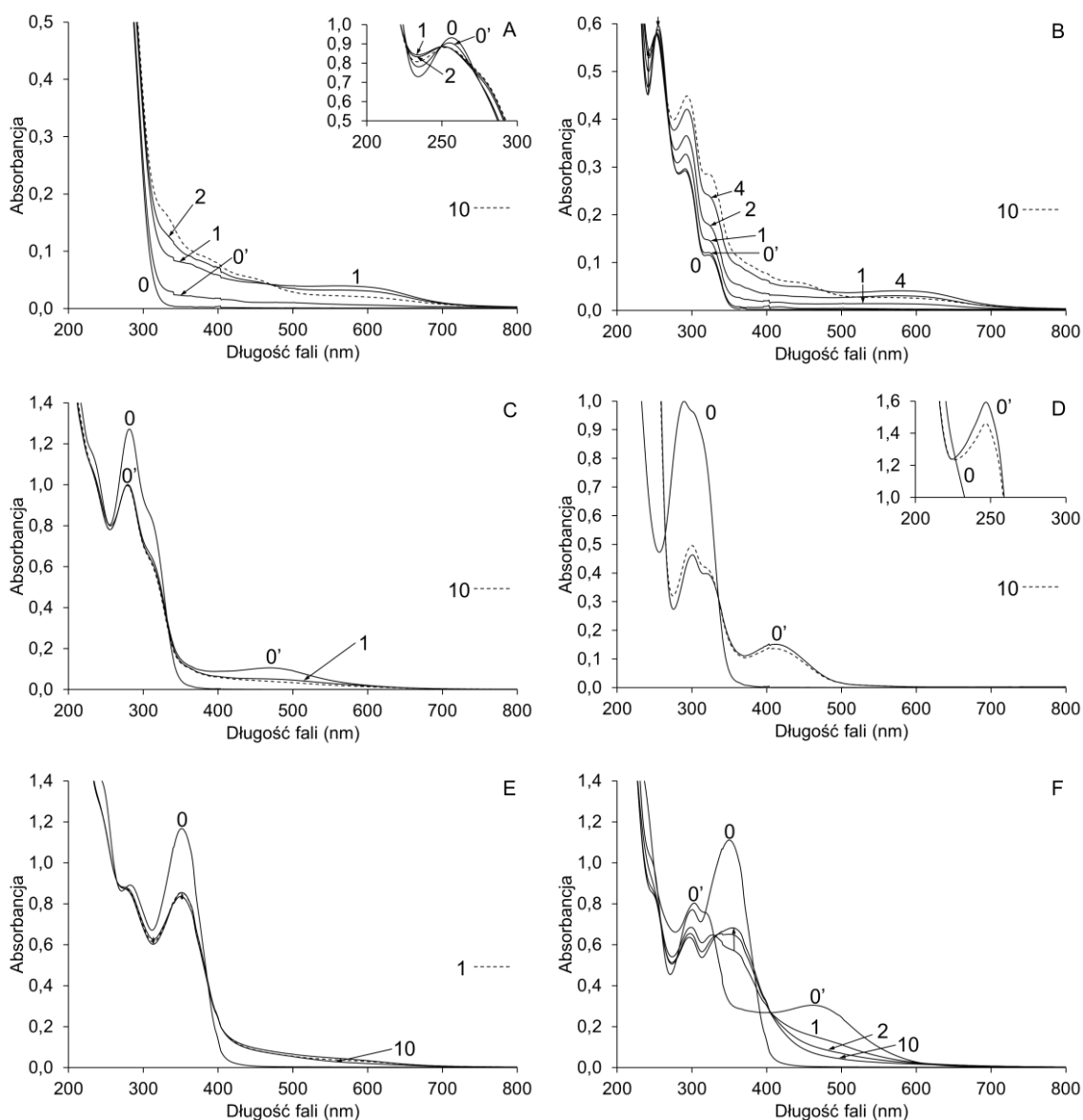
Rysunek 50. Utlenienie mieszaniny 4-aminoantypiryny i DHBS (A), kwasu galusowego (B), kwasu kawowego (C, D) i hispidyny (E, F) przez HRP. Mieszanki reakcyjne składały się z 50 μM badanego związku, 50 μM H_2O_2 i 3,0 $\mu\text{g/ml}$ (A, B, C, E), 50 ng/ml (D) albo 30 ng/ml (F) HRP. Widma mieszanin reakcyjnych były zarejestrowane przed dodaniem enzymu (0), od razu po dodaniu enzymu (0') i po czasie (w minutach) podanym przy każdej krzywej.

i hispidyny oraz reakcji Trindera z udziałem tych dwóch związków nadtlenu wodoru był zużywany w przeciągu pierwszej minuty. Szybkość zużycia nadtlenu wodoru w reakcji z samą hispidyną była znacznie wyższa niż w reakcji kontrolnej nawet przy zastosowaniu 100-krotnie niższego stężenia HRP, co świadczy o tym, że związek ten jest jednym z najlepszych dotychczas poznanych substratów tego enzymu, lepszym niż kwas kawowy, dla którego 60-krotne zmniejszenie stężenia enzymu dało podobny rezultat.



Rysunek 51. Wpływ badanych związków na zużycie nadtlenu wodoru w czasie reakcji Trindera składającej się z 4-aminoantypiryny i DHBS. Mieszaniny reakcyjne składały się z 50 µM 4-aminoantypiryny, 100 µM DHBS, 50 µM H₂O₂ i 3,0 µg/ml HRP bez badanych związków (●) lub z 50 µM badanego związku (▲). Mieszaniny reakcyjne w przypadku utlenienia samych badanych związków składały się z 50 µM badanego związku, 50 µM H₂O₂ i 3,0 µg/ml (◆) albo 50 ng/ml dla kwasu kawowego i 30 ng/ml dla hispidyny (■) HRP.

Różnice w kształcie widm dla reakcji Trindera w obecności kwasu kawowego i hispidyny (Rysunek 49) i reakcji utlenienia samych tych związków (Rysunek 50) wskazywały, że produkty ich utlenienia mogą reagować z innymi składnikami reakcji Trindera. Przeprowadzono więc reakcje utlenienia tych dwóch związków i kwasu galusowego przez HRP tylko z 4-aminoantypiryną lub DHBS. Dla reakcji z kwasem galusowym w obecności każdego z tych związków (Rysunek 52A i B) nie zaobserwowano różnic w widmach w stosunku do reakcji z obydwoima tymi związkami (Rysunek 49B) i reakcji dla samego kwasu galusowego (Rysunek 50B). Na tej podstawie można stwierdzić, że kwas galusowy jest głównym substratem dla HRP w tych układach, a produkt jego utlenienia nie tworzy nowego chromoforu z 4-aminoantypiryną. Widma zarejestrowane w czasie utlenienia kwasu kawowego i hispidyny w obecności DHBS (Rysunek 52D i F) były bardzo podobne do widm zarejestrowanych w czasie utlenienia samych związków badanych (Rysunek 50C i E).

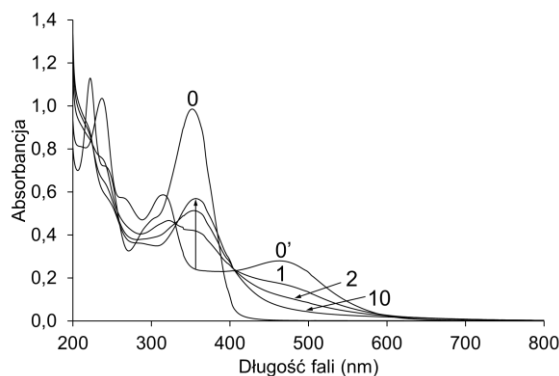


Rysunek 52. Utlenienie kwasu galusowego (A, B), kwasu kawowego (C, D) i hispidyny (E, F) w obecności 4-aminoantypiryny (A, C, E) lub DHBS (B, D, F) przez HRP. Mieszanki reakcyjne składały się z 50 μM badanego związku, 50 μM H_2O_2 , 3,0 $\mu\text{g/ml}$ HRP i 50 μM 4-aminoantypiryny lub 100 μM DHBS. Widma mieszanin reakcyjnych były zarejestrowane przed dodaniem enzymu (0), od razu po dodaniu enzymu (0') i po czasie (w minutach) podanym przy każdej krzywej.

Obecność DHBS nie wpływa więc na ich utlenienie. Jednak widma zarejestrowane w czasie utlenienia kwasu kawowego i hispidyny w obecności 4-aminoantypiryny (Rysunek 52C i E) były zbliżone do widm uzyskanych w czasie reakcji Trindera w obecności tych dwóch związków (Rysunek 49C i D). Wyniki te wskazują, że produkty utlenienia kwasu kawowego i hispidyny reagują z 4-aminoantypiryną dając niestabilne produkty sprzężenia. W przypadku reakcji z kwasem kawowym można przejściowo zaobserwować pasmo absorpcji z maksimum

przy 470 nm, które jednak szybko zanika. W przypadku reakcji z hispidyną takiego pasma się nie obserwuje – prawdopodobnie powstający chromofor rozpada się zbyt szybko. Wyniki te są zbliżone z tymi uzyskanymi niedawno w naszym zespole przez Martynę Mytnik, która testowała kwasy hydroksycynamonowe jako alternatywne substraty dla reakcji Trindera [144]. Kwas *p*-kumarowy, kwas *m*-kumarowy, kwas ferulowy i kwas *izo*ferulowy również dawały niestabilne produkty sprzężenia z 4-aminoantypiryną.

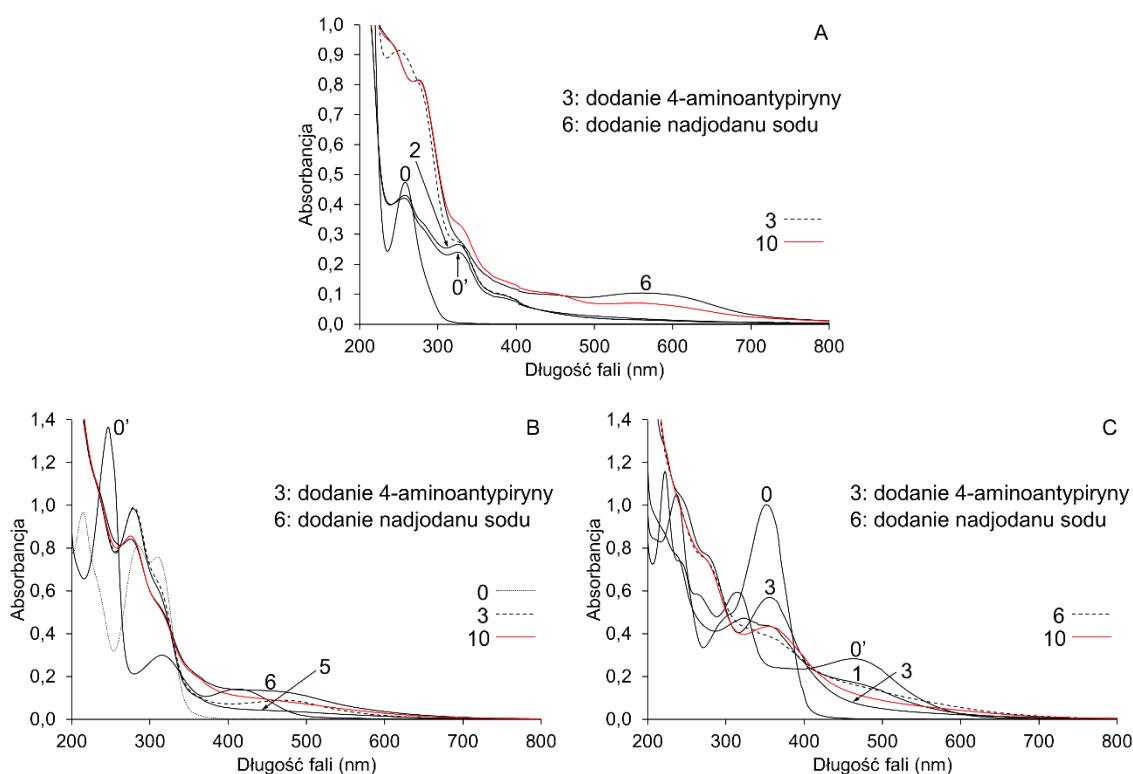
Aby potwierdzić, że to grupa katecholowa hispidyny jest utleniana przez HRP, a nie pierścień 2-hydroksy-4-pironowy, jak to poprzednio postulowano [115], przeprowadzono utlenienie hispidyny za pomocą nadjodanu sodu – utleniacza standardowo stosowanego do utleniania katecholi [143]. Widma produktów po utlenieniu nadjodanem sodu (Rysunek 53) były identyczne z widmami produktów utlenienia przez HRP (Rysunek 50E).



Rysunek 53. Utlenienie hispidyny nadjodanem sodu. Mieszanina reakcyjna składała się z 50 μM hispidyny i 50 μM nadjodanu sodu. Widmo mieszaniny reakcyjnej było zarejestrowane przed dodaniem nadjodanu sodu (0), od razu po dodaniu nadjodanu sodu (0') i po czasie (w minutach) podanym przy każdej krzywej.

Dodatkowo dla sprawdzenia czy 4-aminoantypiryna reaguje z produktami utlenienia tych związków czy raczej z ich rodnikami przeprowadzono utlenienie badanych związków nadjodanem i w momencie zakończenia tej reakcji dodano 4-aminoantypiryny. Dodanie tego związku do kwasu galusowego utlenionego nadjodanem sodu nie spowodowało zmian w widmach (Rysunek 54A), co oznacza, że produkty utlenienia nie ulegają reakcji z 4-aminoantypiryną. Dodanie kolejnej porcji nadjodanu spowodowało jedynie dalsze utlenienie kwasu galusowego, o czym świadczy bardzo podobny kształt widm utlenienia samego kwasu galusowego (Rysunek 50B). W przypadku utlenionego kwasu kawowego dodanie 4-aminoantypiryny powoduje przesunięcie batochromowe (Rysunek 54B). Zanika pasmo *o*-chinonu obecne przy utlenieniu samego kwasu kawowego (Rysunek 50C), czyli

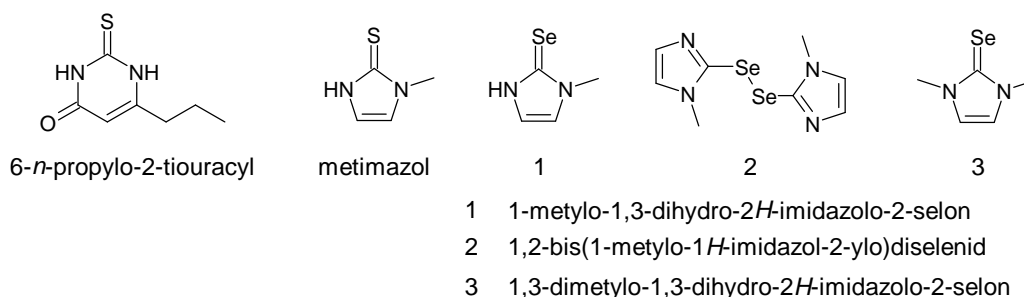
utleniony kwas kawowy jest zdolny do reakcji z tym związkiem, ale powstający produkt jest nietrwały. Dodanie kolejnej porcji nadjodanu powoduje odtworzenie tego związku, o czym świadczy ponowne pojawienie się absorbancji w tym zakresie, i ponownie związek ulega rozpadowi. Produkt utlenienia hispidyny rozpada się bardzo szybko, dlatego w momencie dodania 4-aminoantypiryny nie jest on już obecny w mieszaninie (Rysunek 54C). Dodanie kolejnej porcji nadjodanu nie powoduje pojawienia się pasma charakterystycznego dla produktu utlenienia hispidyny (Rysunek 50E), a jedynie podniesienie absorbancji w szerokim zakresie co odpowiada zdegradowanemu produktowi utlenienia hispidyny (Rysunek 50F). Dlatego nie można stwierdzić czy 4-aminoantypiryna reaguje z hispidyną dając produkt o takim widmie, czy obecność tego związku przyspiesza rozpad utlenionej hispidyny.



Rysunek 54. Reakcje utlenionego nadjodaniem sodu kwasu galusowego (A), kwasu kawowego (B) i hispidyny (C) z 4-aminoantypiryną. Mieszanki reakcyjne zawierały 50 μ M badany związek, 50 μ M nadjodan sodu. W trzeciej minucie reakcji dodano 50 μ M 4-aminoantypirynę a w szóstej minucie dodano 50 μ M nadjodan sodu. Odczynniki dodawano w porcjach stanowiących 1% objętościowy mieszaniny reakcyjnej. Widma mieszanin reakcyjnych były zarejestrowane przed dodaniem nadjodanu sodu (0), od razu po dodaniu pierwszej porcji nadjodanu sodu (0') i po czasie (w minutach) podanym przy każdej krzywej.

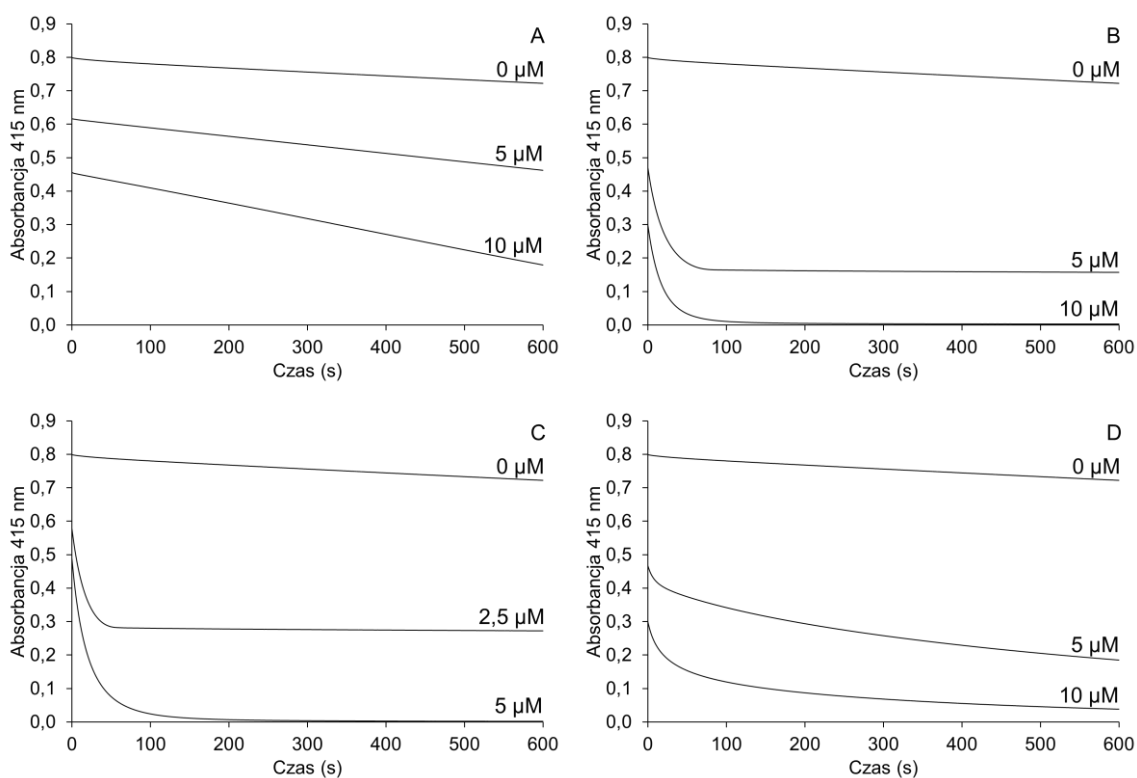
4.5. Reakcje z metimazolem i jego analogami selenowymi

Badania wpływu kwasu galusowego i hispidyny na reakcje katalizowane przez HRP prowadzono w poszukiwaniu potencjalnych leków przeciw nadczynności tarczycy [115]. HRP została w nich zastosowana jedynie jako enzym modelowy dla peroksydazy tarczycowej, której nadmierna aktywność jest najważniejszą przyczyną podwyższonego stężenia hormonów tarczycowych. Inhibitory tego enzymu, takie jak metimazol i 6-*n*-propylo-2-tiouracyl (Rysunek 55), stosowane są w leczeniu nadczynności tarczycy od ponad 70-ciu lat, a poszukiwania nowych związków o takiej aktywności ciągle trwają [11]. Ponieważ peroksydaza tarczycowa, jako enzym błonowy, jest trudna w izolacji i niestabilna, najczęściej stosuje się w tych badaniach enzymy modelowe. Dużo lepszym modelem niż peroksydaza chrzanowa jest jednak laktoperoksydaza, która wykazuje podobną do TRP aktywność katalityczną (m.in. zdolność utlenienia jonów bromkowych, jodkowych i rodankowych) i podobną wrażliwość na inhibitory. Najczęściej jako substrat LPO stosuje się w tych badaniach kwas 2,2'-azyno-bis(3-etylobenzotiazolino-6 sulfonowy) (ABTS). Tak było między innymi w badaniach wpływu selenowych analogów leków przeciwtarczycowych (Rysunek 55) na aktywność LPO [116,145–148]. Leki przeciwtarczycowe i ich selenowe analogi występują głównie w formach tionowych i selenowych, jednak występują one w równowadze z formami tiolowymi i selenolowymi [145]. Ponieważ redukcja kationorodnika ABTS przez tiole jest znana od dawna [149,150], wydawało nam się, że również selenole powinny ulegać takiej reakcji. Przeprowadziliśmy więc reakcje 6-*n*-propylo-2-tiouracylu, metimazolu i selenowych analogów metimazolu z kationorodnikiem ABTS wygenerowanym chemicznie przez utlenienie ABTS nadsiarczanem potasu [151].



Rysunek 55. Struktury leków przeciwtarczycowych i selenowych pochodnych metimazolu.

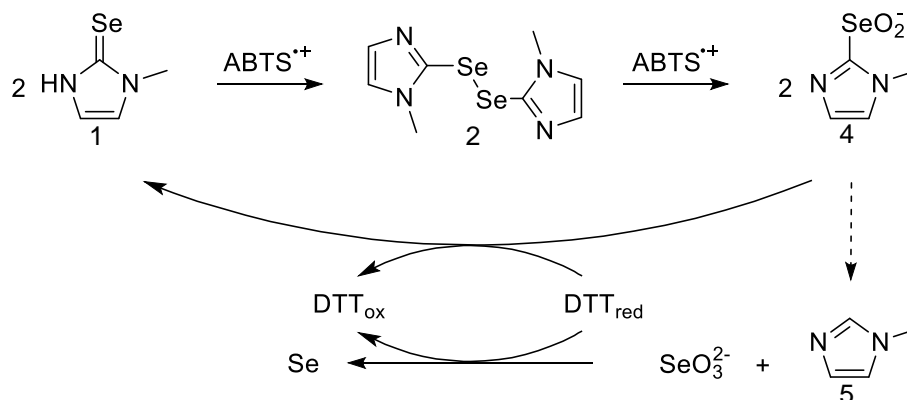
Wszystkie związki szybko reagowały z ABTS^{++} , ale przebieg tych reakcji był różny (Rysunek 56). Dodatek metimazolu powodował natychmiastowe obniżenie absorbancji odpowiadające redukcji około 1,2 równoważnika ABTS^{++} , co wskazuje na przeważające tworzenie się jego disiarczku w początkowej fazie, po której następował dalszy spadek absorbancji ze znacznie mniejszą szybkością. Nie jest możliwe ustalenie dokładnej stechiometrii na podstawie pomiarów spektrofotometrycznych, ze względu na zakres wyznaczonego współczynnika absorpcji ABTS^{++} w obszarze 414-415 nm, który mieści się w przedziale od 31100 do 36000 $\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ [152]. Zachowanie analogów selenowych było inne niż metimazolu. Dodatek 1-metylo-1,3-dihydro-2*H*-imidazolo-2-selonu i 1,2-bis(1-metylo-1*H*-imidazol-2-ylo)diselenidu do ABTS^{++} spowodował gwałtowny spadek absorbancji odpowiadający około odpowiednio 4 i 6 równoważnikom ABTS^{++} . Dalej absorbancja pozostawała stabilna do momentu zakończenia pomiaru. Dla pochodnej dimetylowej



Rysunek 56. Redukcja kationorodnika ABTS przez metimazol (A) 1-metylo-1,3-dihydro-2*H*-imidazolo-2-selon (B), 1,2-bis(1-metylo-1*H*-imidazol-2-ylo)diselenid (C) lub 1,3-dimetylo-1,3-dihydro-2*H*-imidazolo-2-selon (D). Mieszanki reakcyjne zawierały około 25 μM ABTS^{++} i badane związki o stężeniu podanym przy każdej krzywej.

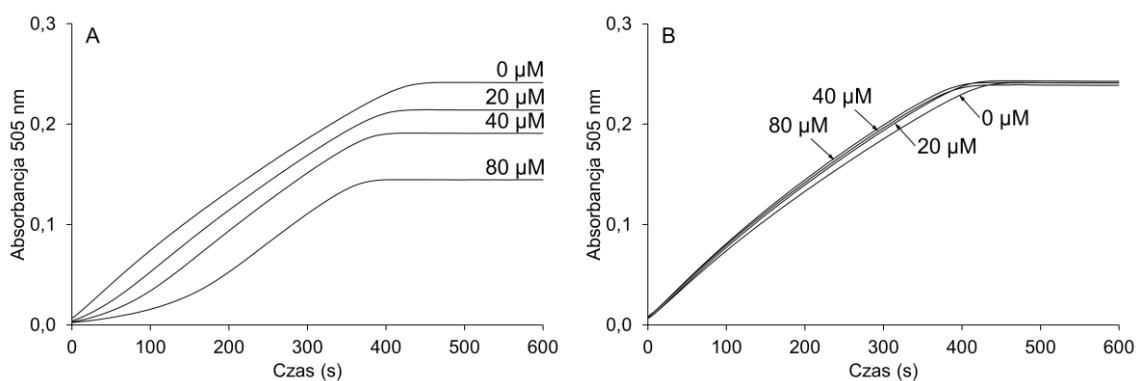
(1,3-dimetylo-1,3-dihydro-2*H*-imidazolo-2-selonu) gwałtowny spadek absorbancji odpowiadał około 2 równoważnikom ABTS^{•+}, po czym następował dalszy ale znacznie wolniejszy spadek, aż absorbancja osiągnęła wartość podobną do reakcji z 1-metylo-1,3-dihydro-2*H*-imidazolo-2-selonem. 1-Metylo-1,3-dihydro-2*H*-imidazolo-2-selon jest nie stabilny na powietrzu, a w reakcji utlenienia 1,3-dimetylo-1,3-dihydro-2*H*-imidazol-2-selenonu nie tworzyły się stabilne produkty. Dlatego pomiary NMR przeprowadzono jedynie dla 1,2-bis(1-metylo-1*H*-imidazol-2-yl)diselenidu, który jest stabilnym produktem utlenienia 1-metylo-1,3-dihydro-2*H*-imidazolo-2-selenonu tlenem atmosferycznym. Reakcje te przeprowadzono generując kationorodnik ABTS w niskim stężeniu przez utlenianie ABTS peroksydazą chrzanową, ponieważ wysokie stężenie tego rodnika uniemożliwia uzyskanie dobrej jakości widm NMR. Początkowo reakcje prowadzono w wodzie deuterowanej (bez buforu). Jednak w tych warunkach występowało nakładanie się sygnałów protonów aromatycznych substratu i produktów (Rysunki D7-D9). Dlatego w dalszej kolejności reakcje przeprowadzono w 100 mM buforze fosforanowym o pH 7,0 (Rysunki D10-D12). W tych warunkach nastąpiło bardzo dobre rozdzielenie sygnałów protonów aromatycznych substratu i produktów. W obu układach reakcyjnych zaobserwowano bardzo szybkie utlenienie substratu w jeden dość stabilny produkt, który powstawał przed wykonaniem pierwszego widma 10 minut po dodaniu nadtlenu wodoru. Kompletnie przekształcenie substratu w ten związek wymagało dodania 3 równoważników nadtlenu wodoru. Produkt ten został następnie zidentyfikowany dzięki widmom HRMS wykonanym przez dr Bożenę Frąckowiak-Wojtasek jako odpowiedni kwas seleninowy (związek 4, Rysunek 57). Ulegał on następnie powolnemu rozkładowi do metyloimidazolu (związek 5, Rysunek 57) i nieorganicznego seleninu. Dla porównania wykonano także pomiary dla reakcji utlenienia diselenidu samym nadtlakiem wodoru (bez enzymu). Stwierdzono powstawanie tych samych produktów, ale szybkość powstawania kwasu seleninowego była znacznie mniejsza niż w reakcji enzymatycznej z udziałem ABTS (reakcja trwała wiele godzin, Rysunek D13). Reakcje z 3 lub więcej równoważnikami H₂O₂ (Rysunki D8 i D9) dały ilościowe tworzenie się kwasu seleninowego. Fakt, że kwas seleninowy rozkładał się do seleninu i 1-metyloimidazolu, a proces ten następował nawet przy podstechiometrycznym stężeniu H₂O₂ (Rysunek D10) świadczy o tym, że jego utlenienie do kwasu selenonowego nie jest koniecznym etapem w tym rozkładzie. Taki przebieg reakcji zaproponowano ostatnio dla utlenienia selenoneiny – selenowego analogu ergotioneiny, i jego diselenku nadtlakiem wodoru do *N*^α,*N*^α,*N*^α-trimetylohistydyny, ponieważ szybkość rozkładu wzrastała wraz ze wzrostem stężenia H₂O₂ [153]. Rozkład kwasu seleninowego otrzymanego z 1,2-bis(1-metylo-1*H*-imidazol-2-yl)diselenidu również

następował szybciej, gdy reakcje prowadzono w obecności nadmiaru nadtlenku wodoru (Rysunek D12). Jednak gdy reakcje prowadzono w wodzie (Rysunki D7-D9), co prowadziło do zakwaszenia środowiska reakcji, zaobserwowano znacznie wolniejszy rozkład kwasu seleninowego, a szybkość tej reakcji nie była zależna od stężenia H_2O_2 (Rysunki D7-D9). Wyniki te wskazują, że w warunkach kwaśnych utlenianie kwasu seleninowego do kwasu selenonowego jest znacznie spowolnione, a udział tej reakcji w deselenacji znacznie spada. Kwas seleninowy otrzymany z 1,2-bis(1-metylo-1*H*-imidazol-2-yl)diselenidu został szybko zredukowany przez ditiotreitrol (DTT) do selenoimidazolu (Rysunek D14), podobnie jak kwas seleninowy otrzymany z selenoneiny, który został zredukowany do selenoneiny przez DTT i glutation [153]. Po dodaniu DTT do reakcji z tym związkiem obserwowano powstawanie ceglasto-czerwonego osadu, a jego ilość była proporcjonalna do czasu inkubacji przed dodaniem środka redukującego. Wynik ten jest zgodny z powolnym rozkładem kwasu seleninowego do seleninu i 1-metyloimidazolu. Zakładamy więc, że ten osad to czerwona odmiana alotropowa selenu powstała z redukcji nieorganicznego selenu. Reakcje utlenienia 1,2-bis(1-metylo-1*H*-imidazol-2-yl)diselenidu kationorodnikiem ABTS oraz redukcji ich produktów przez DTT zostały przedstawione na Rysunek 57.



Rysunek 57. Reakcje selenowego analogu metimidazolu z $ABTS^{*+}$ i DTT.

Sprawdzono także wpływ selenowych pochodnych metimazolu na reakcję Trindera. Pochodna monometylowa (1-metylo-1,3-dihydro-2*H*-imidazolo-2-selenonu) w umiarkowanym stopniu wpływała na szybkość powstawania chromoforu tej reakcji i na końcową wartość absorbancji, natomiast pochodna dimetylowa (1,3-dimetylo-1,3-dihydro-2*H*-imidazolo-2-selonu) nie miała żadnego wpływu (Rysunek 58). Wyniki te można wytłumaczyć szybkością tautomeryzacji selono/selenolowej tych związków – jest ona dużo większa dla pochodnej monometylowej, a jedynie forma selenolowa jest zdolna do redukcji rodnikowych produktów pośrednich reakcji Trindera. Jednak nawet dla pochodnej monometylowej szybkość tej reakcji jest co najwyżej porównywalna z szybkością sprzęgania rodników fenoksylowych i/lub aminoantypirylowych, podobnie jak szybkość redukcji tych rodników przez kwas gentyzynowy, dobesilan wapnia i etamsylat.



Rysunek 58. Wpływ 1-metylo-1,3-dihydro-2*H*-imidazolo-2-selonu (A) i 1,3-dimetylo-1,3-dihydro-2*H*-imidazolo-2-selonu (B) na formowanie się chromoforu reakcji Trindera, składającej się z 4-aminoantypiryny i fenolu. Mieszanki reakcyjne składały się z 50 μM 4-aminoantypiryny, 100 μM fenolu, 50 μM H₂O₂ i 0,5 μg/ml HRP bez badanych związków (0 μM), lub z badanymi związkami o stężeniu podanym przy każdej krzywej.

5. Podsumowanie

Pomiary absorbancji przy jednej długości fali to podstawowa metoda stosowana do monitorowania przebiegu reakcji enzymatycznych, zarówno do celów badawczych, jak i zastosowań praktycznych, np. diagnostycznych. Jest ona bowiem prosta, szybka i tania. Nie wolno jednak zapominać, że absorbancja to jedynie wartość liczbowa będąca wypadkową właściwości wszystkich składników próbki. Jeśli w próbce będą zachodziły reakcje, które będą miały wpływ na tę wartość, nie będzie ona odzwierciedlała stężenia substancji, której pomiar ma dotyczyć. Jeśli badacz nie będzie świadomy tych procesów, wyniki zostaną błędnie zinterpretowane.

W zespole dr hab. Huberta Wojtaska po raz pierwszy wykryto takie zakłócenia dla reakcji katalizowanych przez tyrozinazę ponad 20 lat temu. Wykazano wówczas, że fosfonowy analog 3,4-dihydroksyfenyloglicyny, opisany pierwotnie jako silny inhibitor tego enzymu [154], redukuje jedynie dopachinon, zapobiegając powstawaniu dopachromu, którego stężenie monitoruje się spektrofotometrycznie w standardowym teście używanym do badania aktywności tego enzymu [155]. Ostatnio wykazaliśmy, że podobne zjawisko ma miejsce w przypadku utlenienia L-dopy przez tyrozinazę w obecności ryfampicyny [156], która również została opisana jako inhibitor tego enzymu [157]. Takie błędy są powszechne w przypadku reakcji katalizowanych przez oksydoreduktazy, a szczególnie częste i ważne w reakcjach katalizowanych przez peroksydazę chrzanową, co jest konsekwencją mnogości zastosowań tego enzymu. Zafałszowane wartości absorbancji mogą być konsekwencją działania wielu czynników. Sama substancja zakłócająca może absorbować w zakresie, w którym dokonuje się pomiaru. Takie zakłócenia są jednak łatwe do wykrycia, ponieważ pomiary spektrofotometryczne są zazwyczaj wykonywane w zakresie widzialnym, a więc substancje powodujące takie zakłócenia muszą być barwne. Istotny wpływ na absorbancję wymaga, aby absorpcja w zakresie pomiarowym też była duża, a więc barwa musi być intensywna, co łatwo zauważyć gołym okiem. W tej rozprawie taki efekt wykazano dla doksorubicyny. Dużo trudniej wykryć zakłócenie, gdy jest ono wynikiem nieprzewidzianych reakcji chemicznych. W przypadku enzymatycznych testów diagnostycznych może to być spowodowana albo bezpośrednim utlenieniem związków zakłócających przez peroksydazę chrzanową, albo reakcjami tych związków z produktami pośrednimi lub końcowymi reakcji reporterowej. W obu przypadkach nastąpi zaniżenie wartości absorbancji, jeśli produkty utlenienia związków zakłócających absorbują w zakresie innym niż długość fali stosowana w pomiarach, lub w tym samym zakresie, ale z mniejszym współczynnikiem absorpcji. W tej

rozprawie taki efekt wykazano dla kwasu homogentyzynowego, kwasu gentyzynowego, dobesilanu wapnia, etamsylatu, dobutaminy, kwasu galusowego, kwasu kawowego, hispidyny i mesalazyny. Bardzo rzadko zdarza się, żeby zakłócenia powodowały podwyższenie mierzonej absorpcji, ponieważ taki efekt wymaga nakładania się pasm absorpcji produktu utlenienia związku zakłócającego i chromoforu reakcji reporterowej, a współczynnik absorpcji tego pierwszego musi być większy niż tego drugiego. Układy chromogeniczne zostały zaś tak opracowane, aby dawać chromofory o możliwe wysokich współczynnikach absorpcji. W tej rozprawie nie stwierdzono takiego przypadku.

Wielkość efektu zakłócającego zależy od proporcji szybkości reakcji utlenienia związku zakłócającego i powstawania chromoforu reakcji reporterowej. Im większy ten stosunek, tym zakłócenie większe. W tej rozprawie wykazano to na przykładzie *p*-difenoli. Kwas homogentyzynowy, który jest szybko utleniany i przez peroksydazę chrzanową i przez rodnikowe produkty reakcji Trindera, wykazuje silny efekt zakłócający, natomiast kwas gentyzynowy, dobesilan wapnia i etamsylat, które są bardzo wolno utleniane enzym i wolno przez rodniki fenoksyłowe/aminoantypirylowe, wykazują jedynie umiarkowany efekt. Dla tych związków szybkości zarówno utlenienia enzymatycznego, jak i nieenzymatycznego przez rodnikowe produkty pośrednie reakcji reporterowej zależała głównie od ich właściwości elektrochemicznych (potencjałów redukcyjnych) wynikających z ich struktury (wartości współczynników Hammetta ich podstawników). Jednak nawet jeśli te właściwości są identyczne, szybkość reakcji utlenienia enzymatycznego będzie zależeć od innych elementów strukturalnych, takich jak czynniki steryczne, polarne i hydrofobowe. W tej rozprawie wykazano to na przykładzie dopaminy i dobutaminy.

Należy zaznaczyć, że badania przedstawione w tej rozprawie dotyczą tylko reakcji reporterowej (reakcji Trindera). W przypadku rzeczywistych testów diagnostycznych kolejnym czynnikiem decydującym o wielkości efektu zakłócającego będzie proporcja stężeń związku zakłócającego i analitu. Efekt ten będzie więc szczególnie silny dla analitów, których stężenia fizjologiczne są małe, takich jak kreatynina (stężenie wynoszące 45-90 μM u kobiet i 60-110 μM u mężczyzn). Zakłócenia będą również istotne dla kwasu moczowego, którego stężenie fizjologiczne waha się w granicach 140–360 μM dla kobiet i 200-430 μM dla mężczyzn. Z drugiej strony efekt będzie słaby lub niezauważalny w przypadku agalitów występujących w stężeniach milimolowych, takich jak glukoza (ok. 5 mM), cholesterol (ok. 5 mM) czy triglicerydów (ok. 1.7 mM). Dlatego też dla tej ostatniej grupy agalitów zakłócenia

obserwuje się tylko w przypadku związków, które mogą osiągnąć porównywalne stężenia w płynach fizjologicznych, głównie kwasu askorbinowego.

Spis rysunków i tabel	str.
Rysunek 1. Liczba artykułów opisujących badania z użyciem peroksydazy chrzanowej w latach 1970-2022.....	5
Rysunek 2. Struktura krystaliczna izoenzymu C1A peroksydazy chrzanowej [PDB: 1H5A] [29].....	6
Rysunek 3. Centrum katalityczne peroksydazy chrzanowej [PDB: 1HCH] [29].....	7
Rysunek 4. Wiązanie kwasu benzhydroksamowego w centrum aktywnym HRP [PDB: 2ATJ] [30].	8
Rysunek 5. Wiązanie kwasu ferulowego w centrum aktywnym peroksydazy chrzanowej (A) [PDB: 6ATJ] oraz w centrum aktywnym enzymu ze związanym cyjankiem (B) [PDB: 7ATJ] [31].	9
Rysunek 6. Mechanizm katalityczny peroksydazy chrzanowej w cyklu peroksydacyjnym [32,33].....	10
Rysunek 7. Rola His42 i Arg38 w tworzeniu związku I [34].....	11
Rysunek 8. Mechanizm reakcji utlenienia kwasu ferulowego przez peroksydazę chrzanową [34].....	12
Rysunek 9. Reakcje utlenienia pochodnych alkoholu <i>p</i> -kumarowego przez peroksydazę chrzanową [20].....	12
Rysunek 10. Reakcja utlenienia kwasu indoliloctowego przez peroksydazę chrzanową w cyklu oksydacyjnym [24,35].....	13
Rysunek 11. Reakcja utlenienia gwajakolu przez peroksydazę chrzanową [36].....	13
Rysunek 12. Reakcja utlenienia benzydiny oraz <i>o</i> -dianizydiny przez peroksydazę chrzanową [38,41].....	14
Rysunek 13. Reakcja utlenienia ABTS-u katalizowana przez peroksydazy.	14
Rysunek 14. Schemat reakcji utlenienia fenolu z 4-aminoantypiryną katalizowanej przez peroksydazę chrzanową.	14
Rysunek 15. Schemat reakcji utlenienia 4-aminoantypiryny i kwasu 2,4,6-tribromo-3-hydroksybenzoesowego przez peroksydazę chrzanową [63].	17
Rysunek 16. Schemat reakcji zachodzących w teście diagnostycznym do oznaczenia glukozy [65].....	18
Rysunek 17. Schemat reakcji zachodzących w teście diagnostycznym do oznaczenia kreatyniny [66].....	19
Rysunek 18. Schemat reakcji utlenienia dopaminy przez peroksydazę chrzanową.	20
Rysunek 19. Struktury związków naturalnych wpływających na wyniki testów diagnostycznych.....	21
Rysunek 20. Struktury leków wpływających na wyniki testów diagnostycznych [83].....	23
Rysunek 21. Wpływ badanych <i>p</i> -difenoli na formowanie się chromoforu reakcji Trindera składającej się z 4-aminoantypiryny i fenolu.....	39

Rysunek 22. Wpływ badanych <i>p</i> -difenoli na tworzenie się chromoforu reakcji Trindera składającej się z 4-aminoantypiryny i fenolu.....	40
Rysunek 23. Zmiany absorbancji przy maksimum absorpcji <i>p</i> -chinonów (247 nm) w układzie reakcji Trindera składającej się z 4-aminoantypiryny i fenolu.	41
Rysunek 24. Utlenienie badanych <i>p</i> -difenoli przez peroksydazę chrzanową.....	42
Rysunek 25. Utlenienie badanych <i>p</i> -difenoli przez peroksydazę chrzanową.....	43
Rysunek 26. Utlenienie badanych <i>p</i> -difenoli przez peroksydazę chrzanową.....	44
Rysunek 27. Mechanizmy zakłóceń reakcji Trindera powodowanych przez <i>p</i> -difenole.	44
Rysunek 28. Wpływ badanych <i>p</i> -difenoli na zużycie nadtlenu wodoru w układzie reakcji Trindera składającej się z 4-aminoantypiryny i fenolu.....	45
Rysunek 29. Wpływ badanych <i>p</i> -difenoli na powstawanie chromoforu reakcji Trindera składającej się z 4-aminoantypiryny i DHBS (A, C, E) lub HTIB (B, D, F).....	46
Rysunek 30. Wpływ badanych <i>p</i> -difenoli na formowanie się chromoforu reakcji Trindera składającej się z 4-aminoantypiryny i DHBS (A, C) lub HTIB (B, D).	47
Rysunek 31. Zmiany absorbancji przy maksimum absorpcji <i>p</i> -chinonów (247 nm) w układzie reakcji Trindera składającej się z 4-aminoantypiryny i DHBS.	48
Rysunek 32. Wpływ badanych <i>p</i> -difenoli na zużycie nadtlenu wodoru w czasie reakcji Trindera składającej się z 4-aminoantypiryny i DHBS (A, C) lub HTIB (B, D).	48
Rysunek 33. Struktury mesalazyny, ryfampicyny, mitoksantronu i doksorubicyny.	50
Rysunek 34. Wpływ leków z ugrupowaniem <i>p</i> -difenolowym na formowanie się chromoforu reakcji Trindera składającej się z 4-aminoantypiryny i fenolu.	51
Rysunek 35. Wpływ leków z ugrupowaniem <i>p</i> -difenolowym na tworzenie się chromoforu reakcji Trindera składającej się z 4-aminoantypiryny i fenolu.....	53
Rysunek 36. Utlenienie leków z ugrupowaniem <i>p</i> -difenolowym przez peroksydazę chrzanową.	54
Rysunek 37. Utlenienie mieszaniny doksorubicyny i fenolu przez HRP.	54
Rysunek 38. Wpływ leków z ugrupowaniem <i>p</i> -difenolowym na formowanie się chromoforu reakcji Trindera składającej się z 4-aminoantypiryny i DHBS.....	56
Rysunek 39. Wpływ leków z ugrupowaniem <i>p</i> -difenolowym na tworzenie się chromoforu reakcji Trindera składającej się z 4-aminoantypiryny i DHBS.	56
Rysunek 40. Pomiary absorbancji (A) i zużycia nadtlenu wodoru (B) w czasie reakcji utlenienia dopaminy (■), dobutaminy (▲) i metylovanego analogu dobutaminy (●).	59
Tabela 1. Parametry kinetyczne reakcji utlenienia badanych związków przez peroksydazę chrzanową.	60
Rysunek 41. Mechanizm utlenienia dobutaminy przez peroksydazę chrzanową.....	60
Tabela 2. Podsumowanie wyników dokowania molekularnego.....	61
Rysunek 42. Wyniki dokowania molekularnego dopaminy do centrum aktywnego HRP [PDB: 1HCH].....	62

Rysunek 43. Wyniki dokowania molekularnego <i>R</i> -dobutaminy do centrum aktywnego HRP [PDB: 1HCH].	63
Rysunek 44. Wyniki dokowania molekularnego <i>S</i> -dobutaminy do centrum aktywnego HRP [PDB: 1HCH].	64
Rysunek 45. Wyniki dokowania molekularnego metylowanej pochodnej <i>R</i> -dobutaminy do centrum aktywnego HRP [PDB: 1HCH].	65
Rysunek 46. Wyniki dokowania molekularnego metylowanej pochodnej <i>S</i> -dobutaminy do centrum aktywnego HRP [PDB: 1HCH].	66
Rysunek 47. Struktury kwasu galusowego, kwasu kawowego i hispidyny.	67
Rysunek 48. Wpływ badanych związków na formowanie się chromoforu reakcji Trindera składającej się z 4-aminoantypiryny i DHBS.	68
Rysunek 49. Wpływ badanych związków na powstawanie chromoforu reakcji Trindera składającej się z 4-aminoantypiryny i DHBS.	69
Rysunek 50. Utlenienie mieszaniny 4-aminoantypiryny i DHBS (A), kwasu galusowego (B), kwasu kawowego (C, D) i hispidyny (E, F) przez HRP.	70
Rysunek 51. Wpływ badanych związków na zużycie nadtlenu wodoru w czasie reakcji Trindera składającej się z 4-aminoantypiryny i DHBS.	71
Rysunek 52. Utlenienie kwasu galusowego (A, B), kwasu kawowego (C, D) i hispidyny (E, F) w obecności 4-aminoantypiryny (A, C, E) lub DHBS (B, D, F) przez HRP.	72
Rysunek 53. Utlenienie hispidyny nadjodanem sodu.	73
Rysunek 54. Reakcje utlenionego nadjodanem sodu kwasu galusowego (A), kwasu kawowego (B) i hispidyny (C) z 4-aminoantypiryną.	74
Rysunek 55. Struktury leków przeciwtarczycowych i selenowych pochodnych metimazolu.	75
Rysunek 56. Redukcja kationorodnika ABTS przez metimazol (A) 1-metylo-1,3-dihydro-2 <i>H</i> -imidazolo-2-selon (B), 1,2-bis(1-metylo-1 <i>H</i> -imidazol-2-yl)diselenid (C) lub 1,3-dimetylo-1,3-dihydro-2 <i>H</i> -imidazolo-2-selon (D).	76
Rysunek 57. Reakcje selenowego analogu metimazolu z ABTS ⁺ i DTT.	78
Rysunek 58. Wpływ 1-metylo-1,3-dihydro-2 <i>H</i> -imidazolo-2-selonu (A) i 1,3-dimetylo-1,3-dihydro-2 <i>H</i> -imidazolo-2-selonu (B) na formowanie się chromoforu reakcji Trindera, składającej się z 4-aminoantypiryny i fenolu.	79

Bibliografia

- [1] F. Passardi, G. Theiler, M. Zamocky, C. Cosio, N. Rouhier, F. Teixeira, M. Margis-Pinheiro, V. Ioannidis, C. Penel, L. Falquet, C. Dunand, PeroxiBase: The peroxidase database, *Phytochemistry*. 68 (2007) 1605–1611. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.04.005>.
- [2] P.J. O'Brien, Peroxidases, *Chem Biol Interact*. 129 (2000) 113–139. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(00\)00201-5](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(00)00201-5).
- [3] W.M. Schaffer, T. V. Bronnikova, Peroxidase-ROS interactions, *Nonlinear Dyn*. 68 (2012) 413–430. <https://doi.org/10.1007/s11071-011-0314-x>.
- [4] M. Godlewska, D. Gawel, A.M. Buckle, J.P. Banga, Thyroid Peroxidase Revisited – What's New?, *Hormone and Metabolic Research*. 51 (2019) 765–769. <https://doi.org/10.1055/a-1057-9469>.
- [5] K. V. Fagerstedt, E.M. Kukkola, V.V.T. Koistinen, J. Takahashi, K. Marjamaa, Cell wall lignin is polymerised by class III secretable plant peroxidases in Norway spruce, *J Integr Plant Biol*. 52 (2010) 186–194. <https://doi.org/10.1111/J.1744-7909.2010.00928.X>.
- [6] S. Galijasevic, The development of myeloperoxidase inhibitors, *Bioorg Med Chem Lett*. 29 (2019) 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.11.031>.
- [7] J. Soubhye, M. Gelbcke, P. Van Antwerpen, F. Dufrasne, M.Y. Boufadi, J. Nève, P.G. Furtmüller, C. Obinger, K. Zouaoui Boudjeltia, F. Meyer, From Dynamic Combinatorial Chemistry to *in Vivo* Evaluation of Reversible and Irreversible Myeloperoxidase Inhibitors, *ACS Med Chem Lett*. 8 (2017) 206–210. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.6b00417>.
- [8] A.G. Siraki, The many roles of myeloperoxidase: From inflammation and immunity to biomarkers, drug metabolism and drug discovery, *Redox Biol*. 46 (2021) 102109. <https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2021.102109>.
- [9] M.L. McCormick, T.L. Roeder, M.A. Railsback, B.E. Britigan, Eosinophil peroxidase-dependent hydroxyl radical generation by human eosinophils., *Journal of Biological Chemistry*. 269 (1994) 27914–27919. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)46874-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)46874-3).
- [10] A. Taurog, M.L. Dorris, D.R. Doerge, Mechanism of Simultaneous Iodination and Coupling Catalyzed by Thyroid Peroxidase, *Arch Biochem Biophys*. 330 (1996) 24–32. <https://doi.org/10.1006/abbi.1996.0222>.
- [11] H.B. Burch, D.S. Cooper, Anniversary review: Antithyroid drug therapy: 70 years later, *Eur J Endocrinol*. 179 (2018) R261–R274. <https://doi.org/10.1530/EJE-18-0678>.
- [12] M.I. Sánchez-Ruiz, I. Ayuso-Fernández, J. Rencoret, A.M. González-Ramírez, D. Linde, I. Davó-Siguero, A. Romero, A. Gutiérrez, A.T. Martínez, F.J. Ruiz-Dueñas, Agaricales mushroom lignin peroxidase: From structure–function to degradative capabilities, *Antioxidants*. 10 (2021). <https://doi.org/10.3390/ANTIOX10091446/S1>.

- [13] P. Patricia Twala, A. Mitema, C. Baburam, N. Aliye Feto, Breakthroughs in the discovery and use of different peroxidase isoforms of microbial origin, *AIMS Microbiol.* 6 (2020) 330–349. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020020>.
- [14] V. Brissos, D. Tavares, A.C. Sousa, M.P. Robalo, L.O. Martins, Engineering a Bacterial DyP-Type Peroxidase for Enhanced Oxidation of Lignin-Related Phenolics at Alkaline pH, *ACS Catal.* 7 (2017) 3454–3465. https://doi.org/10.1021/ACSCATAL.6B03331/SUPPL_FILE/CS6B03331_SI_001.PDF.
- [15] N.C. Veitch, Structural determinants of plant peroxidase function, *Phytochemistry Reviews.* 3 (2004) 3–18. <https://doi.org/10.1023/B:PHYT.0000047799.17604.94>.
- [16] M.C. Hoyle, High Resolution of Peroxidase-Indoleacetic Acid Oxidase Isoenzymes from Horseradish by Isoelectric Focusing, *Plant Physiol.* 60 (1977) 787–793. <https://doi.org/10.1104/pp.60.5.787>.
- [17] S. Aibara, T. Kobayashi, Y. Morita, Isolation and properties of basic isoenzymes of horseradish peroxidase, *J Biochem.* 90 (1981) 489–496. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a133496>.
- [18] S. Aibara, H. Yamashua, E. Mori, M. Kato, Y. Morita, Isolation and characterization of five neutral isoenzymes of horseradish peroxidase, *J Biochem.* 92 (1982) 531–539. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a133961>.
- [19] L. Reimann, G.R. Schonbaum, Purification of plant peroxidases by affinity chromatography, in: *Methods Enzymol*, 1978: pp. 514–521. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52056-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52056-9).
- [20] T. Kobayashi, H. Taguchi, M. Shigematsu, M. Tanahashi, Substituent effects of 3,5-disubstituted *p*-coumaryl alcohols on their oxidation using horseradish peroxidase – H₂O₂ as the oxidant, *J Wood Sci.* 51 (2005) 607–614. <https://doi.org/10.1007/s10086-005-0702-2>.
- [21] S. Koutaniemi, M.M. Toikka, A. Kärkönen, M. Mustonen, T. Lundell, L.K. Simola, I.A. Kilpeläinen, T.H. Teeri, Characterization of basic *p*-coumaryl and coniferyl alcohol oxidizing peroxidases from a lignin-forming *Picea abies* suspension culture, *Plant Mol Biol.* 58 (2005) 141–157. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-5345-6>.
- [22] S.-J. Moon, M. Kwon, D. Choi, K. Won, Y.H. Kim, I.-G. Choi, J.W. Choi, In vitro analysis of the monolignol coupling mechanism using dehydrogenative polymerization in the presence of peroxidases and controlled feeding ratios of coniferyl and sinapyl alcohol, *Phytochemistry.* 82 (2012) 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.07.006>.
- [23] N.G. Lewis, L.B. Davin, S. Sarkanen, The Nature and Function of Lignins, in: *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Elsevier, 1999: pp. 617–745. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-091283-7.00085-0>.
- [24] H. Yamazaki, I. Yamazaki, The reaction between indole 3-acetic acid and horseradish peroxidase, *Arch Biochem Biophys.* 154 (1973) 147–159. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(73\)90043-X](https://doi.org/10.1016/0003-9861(73)90043-X).

- [25] K.G. Welinder, Covalent structure of the glycoprotein horseradish peroxidase (EC 1.11.1.7), *FEBS Lett.* 72 (1976) 19–23. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(76\)80804-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(76)80804-6).
- [26] B.Y. Yang, J.S.S. Gray, R. Montgomery, The glycans of horseradish peroxidase, *Carbohydr Res.* 287 (1996) 203–212. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(96\)00073-0](https://doi.org/10.1016/0008-6215(96)00073-0).
- [27] M. Gajhede, D.J. Schuller, A. Henriksen, A.T. Smith, T.L. Poulos, Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution, *Nat Struct Biol.* 4 (1997) 1032–1038. <https://doi.org/10.1038/nsb1297-1032>.
- [28] R.H. Haschke, J.M. Friedhoff, Calcium-related properties of horseradish peroxidase, *Biochem Biophys Res Commun.* 80 (1978) 1039–1042. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(78\)91350-5](https://doi.org/10.1016/0006-291X(78)91350-5).
- [29] G.I. Berglund, G.H. Carlsson, A.T. Smith, H. Szöke, A. Henriksen, J. Hajdu, The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution, *Nature.* 417 (2002) 463–468. <https://doi.org/10.1038/417463a>.
- [30] A. Henriksen, D.J. Schuller, K. Meno, K.G. Welinder, A.T. Smith, M. Gajhede, Structural interactions between horseradish peroxidase C and the substrate benzhydroxamic acid determined by X-ray crystallography, *Biochemistry.* 37 (1998) 8054–8060. <https://doi.org/10.1021/bi980234j>.
- [31] A. Henriksen, A.T. Smith, M. Gajhede, The structures of the horseradish peroxidase C-ferulic acid complex and the ternary complex with cyanide suggest how peroxidases oxidize small phenolic substrates, *Journal of Biological Chemistry.* 274 (1999) 35005–35011. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.49.35005>.
- [32] B. Chance, The kinetics and stoichiometry of the transition from the primary to the secondary peroxidase peroxide complexes, *Arch Biochem Biophys.* 41 (1952) 416–424. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(52\)90470-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(52)90470-0).
- [33] P. George, Chemical nature of the secondary hydrogen peroxide compound formed by cytochrome-C peroxidase and horseradish peroxidase, *Nature.* 169 (1952) 612–613. <https://doi.org/10.1038/169612a0>.
- [34] N.C. Veitch, A.T. Smith, Horseradish peroxidase, in: *Adv Inorg Chem*, 2000: pp. 107–162. [https://doi.org/10.1016/S0898-8838\(00\)51002-2](https://doi.org/10.1016/S0898-8838(00)51002-2).
- [35] L.K. Folkes, P. Wardman, Oxidative activation of indole-3-acetic acids to cytotoxic species—a potential new role for plant auxins in cancer therapy, *Biochem Pharmacol.* 61 (2001) 129–136. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(00\)00498-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0006-2952(00)00498-6).
- [36] H. Tonami, H. Uyama, R. Nagahata, S. Kobayashi, Guaiacol Oxidation Products in the Enzyme-Activity Assay Reaction by Horseradish Peroxidase Catalysis, *Chem Lett.* 33 (2004) 796–797. <https://doi.org/10.1246/cl.2004.796>.
- [37] K.L. Fijalkowski, A. Kwarciak-Kozłowska, Phytotoxicity assay to assess sewage sludge phytoremediation rate using guaiacol peroxidase activity (GPX): A comparison of four growth substrates, *J Environ Manage.* 263 (2020) 110413. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2020.110413>.

- [38] A. Al Claiborne, I. Fridovich, Chemical and Enzymatic Intermediates in the Peroxidation of o-Dianisidine by Horseradish Peroxidase. 1. Spectral Properties of the Products of Dianisidine Oxidation, *Biochemistry*. 18 (1979) 2324–2329. <https://doi.org/10.1021/bi00578a029>.
- [39] H.B. Collier, Are orthotolidine and dianisidine health hazards to laboratory workers?, *Clin Biochem*. 7 (1974) 3–4. [https://doi.org/10.1016/S0009-9120\(74\)90058-7](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(74)90058-7).
- [40] P. Trinder, Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen., *J Clin Pathol*. 22 (1969) 158–161. <https://doi.org/10.1136/jcp.22.2.158>.
- [41] P.D. Josephy, Oxidative activation of benzidine and its derivatives by peroxidases., *Environ Health Perspect*. 64 (1985) 171–178. <https://doi.org/10.1289/ehp.8564171>.
- [42] B. Mishra, K.I. Priyadarsini, H. Mohan, G. Mugesh, Horseradish peroxidase inhibition and antioxidant activity of ebselen and related organoselenium compounds, *Bioorg Med Chem Lett*. 16 (2006) 5334–5338. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.07.085>.
- [43] J.D. Castaño, J. Zhang, J.S. Schilling, Evaluation of colorimetric assays for determination of H₂O₂ *in planta* during fungal wood decomposition, *J Microbiol Methods*. 145 (2018) 10–13. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.12.004>.
- [44] E. Emerson, The condensation of aminoantipyrine. II. A new color test for phenolic compounds, *J Org Chem*. 08 (1943) 417–428. <https://doi.org/10.1021/jo01193a004>.
- [45] D. Job, H.B. Dunford, Substituent effect on the oxidation of phenols and aromatic amines by horseradish peroxidase compound I, *Eur J Biochem*. 66 (1976) 607–614. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1976.tb10588.x>.
- [46] H.B. Dunford, A.J. Adeniran, Hammett $\rho\sigma$ correlation for reactions of horseradish peroxidase compound II with phenols, *Arch Biochem Biophys*. 251 (1986) 536–542. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(86\)90361-9](https://doi.org/10.1016/0003-9861(86)90361-9).
- [47] M.J.H. Van Haandel, M.M.J. Claassens, N. Van der Hout, M.G. Boersma, J. Vervoort, I.M.C.M. Rietjens, Differential substrate behaviour of phenol and aniline derivatives during conversion by horseradish peroxidase, *BBA-Protein Struct M*. 1435 (1999) 22–29. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(99\)00199-5](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(99)00199-5).
- [48] M.A. Gilabert, A.N.P. Hiner, P.A. García-Ruiz, J. Tudela, F. García-Molina, M. Acosta, F. García-Cánovas, J.N. Rodríguez-López, Differential substrate behaviour of phenol and aniline derivatives during oxidation by horseradish peroxidase: kinetic evidence for a two-step mechanism, *BBA-Proteins Proteom*. 1699 (2004) 235–243. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2004.03.003>.
- [49] R.H. Carvalho, F. Lemos, M.A.N.D.A. Lemos, V. Vojinović, L.P. Fonseca, J.M.S. Cabral, Kinetic modelling of phenol co-oxidation using horseradish peroxidase, *Bioprocess Biosyst Eng*. 29 (2006) 99–108. <https://doi.org/10.1007/s00449-006-0057-0>.

- [50] C.D. Fernando, P. Soysa, Optimized enzymatic colorimetric assay for determination of hydrogen peroxide (H₂O₂) scavenging activity of plant extracts, *MethodsX*. 2 (2015) 283–291. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2015.05.001>.
- [51] M. Hamid, Khalil-ur-Rehman, Potential applications of peroxidases, *Food Chem.* 115 (2009) 1177–1186. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.035>.
- [52] G.R. Lopes, D.C.G.A. Pinto, A.M.S. Silva, Horseradish peroxidase (HRP) as a tool in green chemistry, *RSC Adv.* 4 (2014) 37244–37265. <https://doi.org/10.1039/c4ra06094f>.
- [53] F.W. Krainer, A. Glieder, An updated view on horseradish peroxidases: recombinant production and biotechnological applications, *Appl Microbiol Biotechnol.* 99 (2015) 1611–1625. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6346-7>.
- [54] F.K. de Oliveira, L.O. Santos, J.G. Buffon, Mechanism of action, sources, and application of peroxidases, *Food Research International.* 143 (2021). <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2021.110266>.
- [55] C. Yang, M.E. Denno, P. Pyakurel, B.J. Venton, Recent trends in carbon nanomaterial-based electrochemical sensors for biomolecules: A review, (2015). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.05.049>.
- [56] S. Sakai, M. Nakahata, Horseradish Peroxidase Catalyzed Hydrogelation for Biomedical, Biopharmaceutical, and Biofabrication Applications, *Chem Asian J.* 12 (2017) 3098–3109. <https://doi.org/10.1002/asia.201701364>.
- [57] M. Khanmohammadi, M.B. Dastjerdi, A. Ai, A. Ahmadi, A. Godarzi, A. Rahimi, J. Ai, Horseradish peroxidase-catalyzed hydrogelation for biomedical applications, *Biomater Sci.* 6 (2018) 1286–1298. <https://doi.org/10.1039/C8BM00056E>.
- [58] N. Gupta, C. Gupta, S. Sharma, B. Rathi, R.K. Sharma, H.B. Bohidar, Magnetic iron oxide nanoparticles encapsulating horseradish peroxidase (HRP): synthesis, characterization and carrier for the generation of free radicals for potential applications in cancer therapy, *RSC Adv.* 6 (2016) 111099–111108. <https://doi.org/10.1039/C6RA24586B>.
- [59] A.S. Drozdov, P.I. Nikitin, J.M. Rozenberg, Systematic review of cancer targeting by nanoparticles revealed a global association between accumulation in tumors and spleen, *Int J Mol Sci.* 22 (2021). <https://doi.org/10.3390/IJMS222313011/S1>.
- [60] P. Trinder, Determination of blood glucose using 4-amino phenazone as oxygen acceptor., *Am J Clin Pathol.* 51 (1969) 549–549. https://doi.org/10.1093/ajcp/51.4_ts.549.
- [61] D. Barham, P. Trinder, An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system, *Analyst.* 97 (1972) 142–145. <https://doi.org/10.1039/an9729700142>.

- [62] P. Fossati, L. Prencipe, G. Berti, Use of 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine., *Clin Chem.* 26 (1980) 227–231. <https://doi.org/10.1093/CLINCHEM/26.2.227>.
- [63] P. Trinder, D. Webster, Determination of HDL-cholesterol using 2,4,6-tribromo-3-hydroxybenzoic acid with a commercial CHOD-PAP reagent, *Ann Clin Biochem.* 21 (1984) 430–433. <https://doi.org/10.1177/000456328402100516>.
- [64] O. Wiewiorka, M. Dastyh, Z. Čermáková, Trinder Reaction in Clinical Biochemistry – Benefits and Limits, *Chem Listy.* 111 (2017) 186–191. <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/97/97>.
- [65] F.G. Menezes, A.C.O. Neves, D.F. de Lima, S.D. Lourenço, L.C. da Silva, K.M.G. de Lima, Bioorganic concepts involved in the determination of glucose, cholesterol and triglycerides in plasma using the enzymatic colorimetric method, *Quim Nova.* 38 (2015) 944–947. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150040>.
- [66] B.W. G Guder G E Hoffmann, A. Hubbuch, W.A. Poppe, J. Siedel, C.P. Price, Multicentre evaluation, *Clin Chem Lab Med.* 24 (1986) 889–902. <https://doi.org/10.1515/cclm.1986.24.11.889>.
- [67] J.A. Weber, A.P. van Zanten, Interferences in Current Methods for Measurements of Creatinine, *Clin. Chem.* 37 (1991) 695–700. <https://doi.org/10.1093/clinchem/37.5.695>.
- [68] R.H. White-Stevens, Interference by ascorbic acid in test systems involving peroxidase. I. Reversible indicators and the effects of copper, iron, and mercury, *Clin Chem.* 28 (1982) 578–588. <https://doi.org/10.1093/clinchem/28.4.578>.
- [69] F. Martinello, E.L. da Silva, Ascorbic acid interference in the measurement of serum biochemical parameters: In vivo and in vitro studies, *Clin Biochem.* 39 (2006) 396–403. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2005.11.011>.
- [70] F. Martinello, E. Luiz da Silva, Mechanism of ascorbic acid interference in biochemical tests that use peroxide and peroxidase to generate chromophore, *Clinica Chimica Acta.* 373 (2006) 108–116. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2006.05.012>.
- [71] G.A. Maguire, C.P. Price, Evidence for interference by ascorbate in the measurement of cerebrospinal fluid glucose by a kinetic glucose oxidase/peroxidase procedure, *Clin Chem.* 29 (1983) 1810–1812. <https://doi.org/10.1093/clinchem/29.10.1810>.
- [72] R.H. White-Stevens, L.R. Stover, Interference by ascorbic acid in test systems involving peroxidase. II. Redox-coupled indicator systems, *Clin Chem.* 28 (1982) 589–595. <https://doi.org/10.1093/clinchem/28.4.589>.
- [73] Y.I. Tur’yan, R. Kohen, Formal redox potentials of the dehydro-l-ascorbic acid/l-ascorbic acid system, *Journal of Electroanalytical Chemistry.* 380 (1995) 273–277. [https://doi.org/10.1016/0022-0728\(94\)03524-7](https://doi.org/10.1016/0022-0728(94)03524-7).

- [74] J.N. Rodríguez-López, M.A. Gilabert, J. Tudela, R.N.F. Thorneley, F. García-Cánovas, Reactivity of Horseradish Peroxidase Compound II toward Substrates: Kinetic Evidence for a Two-Step Mechanism, *Biochemistry*. 39 (2000) 13201–13209. <https://doi.org/10.1021/bi001150p>.
- [75] D.L. Witte, L.F. Brown, R.D. Feld, Effects of bilirubin on detection of hydrogen peroxide by use of peroxidase., *Clin Chem*. 24 (1978) 1778–1782. <https://doi.org/10.1093/clinchem/24.10.1778>.
- [76] T.W. Sedlak, M. Saleh, D.S. Higginson, B.D. Paul, K.R. Juluri, S.H. Snyder, Bilirubin and glutathione have complementary antioxidant and cytoprotective roles, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106 (2009) 5171–5176. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0813132106>.
- [77] K.T. Koprowicz, D.S. Ooi, J.G. Donnelly, Influence of dopamine on peroxidase-based assays, *Clin Chem*. 42 (1996) 1502–1502. <https://doi.org/10.1093/clinchem/42.9.1502>.
- [78] B.S. Karon, T.M. Daly, M.G. Scott, Mechanisms of dopamine and dobutamine interference in biochemical tests that use peroxide and peroxidase to generate chromophore, *Clin Chem*. 44 (1998) 155–160. <https://doi.org/10.1093/clinchem/44.1.155>.
- [79] M. Zhu, X. Huang, J. Li, H. Shen, Peroxidase-based spectrophotometric methods for the determination of ascorbic acid, norepinephrine, epinephrine, dopamine and levodopa, *Anal Chim Acta*. 357 (1997) 261–267. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(97\)00561-8](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(97)00561-8).
- [80] A.E. Poliakov, A. V. Dumshakova, S. V. Muginova, T.N. Shekhovtsova, A peroxidase-based method for the determination of dopamine, adrenaline, and α -methyldopa in the presence of thyroid hormones in pharmaceutical forms, *Talanta*. 84 (2011) 710–716. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.01.074>.
- [81] M. García-Moreno, M. Moreno-Conesa, J.N. Rodríguez-López, F. García-Cánovas, R. Varón, Oxidation of 4-*tert*-butylcatechol and dopamine by hydrogen peroxide catalysed by horseradish peroxidase, *Biol Chem*. 380 (1999) 689–694. <https://doi.org/10.1515/BC.1999.085>.
- [82] F. Zoppi, D. Fenili, Drug interferences in reactions for detecting hydrogen peroxide by means of peroxidase, *Clin Chem*. 26 (1980) 1229–1230. <https://doi.org/10.1093/clinchem/26.8.1229>.
- [83] B. Gąsowska-Bajger, Y. Nishigaya, K. Hirsz-Wiktorzak, A. Rybczyńska, T. Yamazaki, H. Wojtasek, Interference of carbidopa and other catechols with reactions catalyzed by peroxidases, *BBA-Gen Subjects*. 1862 (2018) 1626–1634. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.04.007>.
- [84] A.K. Saenger, C. Lockwood, C.L. Snozek, T.C. Milz, B.S. Karon, M.G. Scott, A.S. Jaffe, Catecholamine Interference in Enzymatic Creatinine Assays, *Clin Chem*. 55 (2009) 1732–1736. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.127373>.

- [85] S.L. Curtis, B.P. Norman, A.M. Milan, J.A. Gallagher, B. Olsson, L.R. Ranganath, N.B. Roberts, Interference of hydroxyphenylpyruvic acid, hydroxyphenyllactic acid and tyrosine on routine serum and urine clinical chemistry assays; implications for biochemical monitoring of patients with alkaptonuria treated with nitisinone, *Clin Biochem.* 71 (2019) 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2019.06.010>.
- [86] P.R. Loken, M.J. Magera, W. Introne, S. Tortorelli, D. Gavrilov, D. Oglesbee, P. Rinaldo, D. Matern, K. Raymond, Homogentisic acid interference in routine urine creatinine determination, *Mol Genet Metab.* 100 (2010) 103–104. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2010.01.006>.
- [87] S.L. Curtis, N.B. Roberts, L.R. Ranganath, Interferences of homogentisic acid (HGA) on routine clinical chemistry assays in serum and urine and the implications for biochemical monitoring of patients with alkaptonuria, *Clin Biochem.* 47 (2014) 640–647. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2013.12.016>.
- [88] S. Pauwels, D. Cassiman, P. Vermeersch, Evaluation of the interference by homogentisic acid and other organic acids on the enzymatic and Jaffé method creatinine assay, *Clin Chem Lab Med.* 50 (2012) 749–750. <https://doi.org/10.1515/cclm.2011.836>.
- [89] S. Jaidka, R. Somani, D.J. Singh, S. Shafat, Homogentisic acid interferes with the enzymatic assay and the Jaffe method, *Acta Clin Belg.* 67 (2012) 64–69. <https://doi.org/10.2143/acb.67.1.2062635>.
- [90] Y. Moriwaki, T. Yamamoto, Y. Nasako, H. Ohata, S. Takahashi, Z. Tsutsumi, J.-I. Yamakita, K. Higashino, ‘Pseudohypouricosuria’ in alcaptonuria: homogentisic acid interference in the measurement of urinary uric acid with the uricase - peroxidase reaction, *Ann Clin Biochem.* 36 (1999) 501–503. <https://doi.org/10.1177/000456329903600414>.
- [91] S.L. Curtis, N.B. Roberts, L.R. Ranganath, Interferences of homogentisic acid (HGA) on routine clinical chemistry assays in serum and urine and the implications for biochemical monitoring of patients with alkaptonuria, *Clin Biochem.* 47 (2014) 640–647. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2013.12.016>.
- [92] R.B. Davis, Oxidation of Homogentisic Acid by Nitrous Acid and its Interference in the Determination of 5-Hydroxyindoleacetic Acid, *Clin Chem.* 8 (1962) 660–664. <https://doi.org/10.1093/clinchem/8.6.660>.
- [93] I. Kaufmann-Raab, H.G. Jonen, E. Jähnchen, G.F. Kahl, U. Groth, Interference by acetaminophen in the glucose oxidase-peroxidase method for blood glucose determination, *Clin Chem.* 22 (1976) 1729–1731. <https://doi.org/10.1093/clinchem/22.10.1729>.
- [94] P. Sharp, Interference in glucose oxidase-peroxidase blood glucose methods, *Clin Chim Acta.* 40 (1972) 115–120. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(72\)90257-4](https://doi.org/10.1016/0009-8981(72)90257-4).
- [95] E. Nakashima, J. Nakamura, Y. Hamada, N. Koh, F. Sakakibara, N. Hotta, Interference by gliclazide in the glucose oxidase/peroxidase method for glucose assay, *Diabetes Res Clin Pract.* 30 (1995) 149–152. [https://doi.org/10.1016/0168-8227\(95\)01161-7](https://doi.org/10.1016/0168-8227(95)01161-7).

- [96] J.R. Genzen, J.J. Hunsaker, L.S. Nelson, B.A. Faine, M.D. Krasowski, *N*-acetylcysteine interference of Trinder-based assays, *Clin. Biochem.* 49 (2016) 100–104. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.10.005>.
- [97] R.R. Tuttle, J. Mills, Dobutamine. Development of a new catecholamine to selectively increase cardiac contractility, *Circ Res.* 36 (1975) 185–196. <https://doi.org/10.1161/01.RES.36.1.185>.
- [98] A. Sadler, V.V. Subrahmanyam, D. Ross, Oxidation of catechol by horseradish peroxidase and human leukocyte peroxidase: reactions of *o*-benzoquinone and *o*-benzosemiquinone, *Toxicol Appl Pharmacol.* 93 (1988) 62–71. [https://doi.org/10.1016/0041-008x\(88\)90025-7](https://doi.org/10.1016/0041-008x(88)90025-7).
- [99] O. Wiewiorka, M. Dastych, Z. Čermáková, Z. Cermakova, Strong negative interference of ethamsylate (Dicynone (R)) in serum creatinine quantification via enzymatic assay using Trinder reaction, *Scand J Clin Lab Invest.* 73 (2013) 449–451. <https://doi.org/10.3109/00365513.2013.794300>.
- [100] M. Dastych, O. Wiewiorka, M. Benovska, Ethamsylate (Dicynone (R)) interference in determination of serum creatinine, uric acid, triglycerides, and cholesterol in assays involving the Trinder reaction; *in vivo* and *in vitro*, *Clin. Lab.* 60 (2014) 1373–1376. <https://doi.org/10.7754/clin.lab.2013.130902>.
- [101] X.Z. Guo, L.A. Hou, X.Q. Cheng, T.J. Zhang, S.L. Yu, H.L. Fang, L.Y. Xia, Z.H. Qi, X.Z. Qin, L. Zhang, Q. Liu, L. Liu, S.L. Chi, Y.Y. Hao, L. Qiu, Strong negative interference by calcium dobesilate in sarcosine oxidase assays for serum creatinine involving the Trinder reaction, *Medicine.* 94 (2015) 1–7. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000000905>.
- [102] X.Z. Guo, L.A. Hou, Y.C. Yin, J. Wu, F. Zhao, L.Y. Xia, X.Q. Cheng, Q. Liu, L. Liu, E.M. Xu, L. Qiu, Negative interferences by calcium dobesilate in the detection of five serum analytes involving Trinder reaction-based assays, *PLoS One.* 13 (2018) 2–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192440>.
- [103] A. Orieux, J. Brunier, C. Rigotherier, B. Pinson, S. Dabernat, M.-L. Bats, Plasma creatinine below limit of quantification in a patient with acute kidney injury, *Clinica Chimica Acta.* 524 (2022) 101–105. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2021.12.001>.
- [104] R.S. Silva, C.P. Domingueti, M.S. Tinoco, J.C. Veloso, M.L. Pereira, A.O. Baldoni, D.R.A. Rios, Interference of medicines in laboratory exams, *J Bras Patol Med Lab.* 57 (2021) 1–15. <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20210014>.
- [105] G. Constantinescu, M. Bidlingmaier, M. Gruber, M. Peitzsch, D.M. Poitz, A.E. Van Herwaarden, K. Langton, C. Kunath, M. Reincke, J. Deinum, J.W.M. Lenders, T. Hofmockel, S.R. Bornstein, G. Eisenhofer, Mass spectrometry reveals misdiagnosis of primary aldosteronism with scheduling for adrenalectomy due to immunoassay interference, (2020). <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.04.019>.

- [106] V. Pandya, J.J.H. Hunsaker, S.L. La'ulu, J.R. Genzen, E.L. Frank, L.M. Johnson, J.W. Rudolf, Excessively low cholesterol and triglyceride levels in an apparently healthy patient, *Clin Biochem.* 96 (2021) 78–81.
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2021.07.001>.
- [107] J.C. Seegmiller, K.A. Larson, A.K. Saenger, An investigation of enzymatic creatinine interference in a patient receiving dopamine and dobutamine, *Clin Biochem.* 73 (2019) 115–117. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2019.08.001>.
- [108] S.J. Klebanoff, An Effect of Thyroxine and Related Compounds on the Oxidation of Certain Hydrogen Donors by the Peroxidase System, *Journal of Biological Chemistry.* 234 (1959) 2437–2442. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)69831-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)69831-X).
- [109] S.J. Klebanoff, An Effect of Thyroxine on the Oxidation of Reduced Pyridine Nucleotides by the Peroxidase System, *Journal of Biological Chemistry.* 234 (1959) 2480–2485. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)69838-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)69838-2).
- [110] S.J. Klebanoff, An interrelationship between ergothioneine, certain phenolic hormones and peroxidase, *Biochim Biophys Acta.* 56 (1962) 460–469.
[https://doi.org/10.1016/0006-3002\(62\)90597-8](https://doi.org/10.1016/0006-3002(62)90597-8).
- [111] K. Takayama, M. Nakano, Mechanism of Thyroxine-Mediated Oxidation of Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide in Peroxidase–H₂O₂ System, *Biochemistry.* 16 (1977) 1921–1926. <https://doi.org/10.1021/bi00628a025>.
- [112] U. Takahama, Enhancement of the peroxidase-dependent oxidation of DOPA by components of *Vicia* leaves, *Phytochemistry.* 46 (1997) 427–432.
[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00336-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00336-1).
- [113] U. Takahama, K. Yoshitama, Hydroxycinnamic acid esters enhance peroxidase-dependent oxidation of 3,4-dihydroxyphenylalanine. Differences in the enhancement among the esters, *J. Plant Res.* 111 (1998) 97–100.
<https://doi.org/10.1007/BF02507155>.
- [114] X. Guo, F. Zhao, Y. Yin, D. Wang, L. Hou, J. Wu, D. Li, X. Cheng, L. Xia, E. Xu, L. Qiu, Calcium dobesilate: A drug treatment for diabetic retinopathy can negatively interfere with the measurement of glycated albumin using the enzymatic method, *Clinica Chimica Acta.* 483 (2018) 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.04.014>.
- [115] K. Benarous, F.Z. Benali, I.C. Bekhaoua, M. Yousfi, Novel potent natural peroxidases inhibitors with in vitro assays, inhibition mechanism and molecular docking of phenolic compounds and alkaloids, *J Biomol Struct Dyn.* 39 (2021) 7168–7180.
<https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1808073>.
- [116] G. Roy, P.N. Jayaram, G. Mugesh, Inhibition of lactoperoxidase-catalyzed oxidation by imidazole-based thiones and selones: A mechanistic study, *Chem Asian J.* 8 (2013) 1910–1921. <https://doi.org/10.1002/asia.201300274>.
- [117] C. Gay, J.M. Gebicki, A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric–xylenol orange hydroperoxide assay, *Anal Biochem.* 284 (2000) 217–220.
<https://doi.org/10.1006/abio.2000.4696>.

- [118] G.R. Schonbaum, S. Lo, Interaction of Peroxidases with Aromatic Peracids and Alkyl Peroxides, *Journal of Biological Chemistry*. 247 (1972) 3353–3360. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)45252-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)45252-6).
- [119] G.M. Morris, H. Ruth, W. Lindstrom, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell, A.J. Olson, AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility, *J Comput Chem*. 30 (2009) 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>.
- [120] S. Forli, R. Huey, M.E. Pique, M.F. Sanner, D.S. Goodsell, A.J. Olson, Computational protein–ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite, *Nat Protoc*. 11 (2016) 905–919. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.051>.
- [121] M.F. Sanner, Python: a programming language for software integration and development, *J. Mol. Graph. Model*. 17 (1999) 57–61. <https://doi.org/10.1016/j.str.2005.01.010>.
- [122] H.R. Hallingbäck, R.R. Gabdouliline, R.C. Wade, Comparison of the binding and reactivity of plant and mammalian peroxidases to indole derivatives by computational docking, *Biochemistry*. 45 (2006) 2940–2950. <https://doi.org/10.1021/bi051510e>.
- [123] S. Pauwels, D. Cassiman, P. Vermeersch, Evaluation of the interference by homogentisic acid and other organic acids on the enzymatic and Jaff method creatinine assay, *Clin Chem Lab Med*. 50 (2012) 749–750. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2011.836/MACHINEREADABLECITATION/RIS>.
- [124] R.A. Milch, E.D. Titus, T.L. Loo, Atmospheric oxidation of homogentisic acid: Spectrophotometric studies, *Science* (1979). 126 (1957) 209–210.
- [125] A.J. Kettle, C.C. Winterbourn, Oxidation of hydroquinone by myeloperoxidase. Mechanism of stimulation by benzoquinone, *Journal of Biological Chemistry*. 267 (1992) 8319–8324.
- [126] M.T. Huynh, C.W. Anson, A.C. Cavell, S.S. Stahl, S. Hammes-Schiffer, Quinone 1 e⁻ and 2 e⁻/2 H⁺ Reduction Potentials: Identification and Analysis of Deviations from Systematic Scaling Relationships, *J Am Chem Soc*. 138 (2016) 15903–15910. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b05797>.
- [127] M. Eslami, M. Namazian, H.R. Zare, Electrooxidation of homogentisic acid in aqueous and mixed solvent solutions: Experimental and theoretical studies, *Journal of Physical Chemistry B*. 117 (2013) 2757–2763. <https://doi.org/10.1021/jp3121325>.
- [128] E. Pelizzetti, E. Mentasti, C. Baiocchi, Kinetics and mechanism of oxidation of quinols by hexachloroiridate(IV) in aqueous acidic perchlorate media, *Journal of Physical Chemistry*. 80 (1976) 2979–2982. <https://doi.org/10.1021/j100908a014>.
- [129] J. Sakurada, R. Sekiguchi, K. Sato, T. Hosoya, Kinetic and molecular orbital studies on the rate of oxidation of monosubstituted phenols and anilines by horseradish peroxidase compound II, *Biochemistry*. 29 (1990) 4093–4098. <https://doi.org/10.1021/bi00469a011>.

- [130] M. Novak, K.A. Martin, Steric Effects on the pKa of N-Protonated N-Acetyl-p-benzoquinone Imines: Evidence for Hydration via N-Protonation, *Journal of Organic Chemistry*. 56 (1991) 1585–1590.
https://doi.org/10.1021/JO00004A045/SUPPL_FILE/JO00004A045_SI_001.PDF.
- [131] F. de J.N. do Santos, V.F. Ximenes, L.M. da Fonseca, O.M.M. de Faria Oliveira, I.L. Brunetti, Horseradish Peroxidase-Catalyzed Oxidation of Rifampicin: Reaction Rate Enhancement by Co-oxidation with Anti-inflammatory Drugs, *Biol Pharm Bull*. 28 (2005) 1822–1826. <https://doi.org/10.1248/bpb.28.1822>.
- [132] W.J. Sandborn, S.B. Hanauer, A. Buch, Comparative pharmacokinetics of equimolar doses of 5-aminosalicylate administered as oral mesalamine (Asacol) and balsalazide: a randomized, single-dose, crossover study in healthy volunteers ¹, *Aliment Pharmacol Ther*. 19 (2004) 1089–1098. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2004.01964.x>.
- [133] M.M. Van De Meeberg, J.P.D. Schultheiss, B. Oldenburg, H.H. Fidder, A.D.R. Huitema, Does the 5-Aminosalicylate Concentration Correlate with the Efficacy of Oral 5-Aminosalicylate and Predict Response in Patients with Inflammatory Bowel Disease? A Systematic Review, *Digestion*. 101 (2020) 245–261.
<https://doi.org/10.1159/000499331>.
- [134] L. Aït Moussa, O. El Bouazzi, S. Serragui, D. Soussi Tanani, A. Soulaymani, R. Soulaymani, Rifampicin and isoniazid plasma concentrations in relation to adverse reactions in tuberculosis patients: a retrospective analysis, *Ther Adv Drug Saf*. 7 (2016) 239–247. <https://doi.org/10.1177/2042098616667704>.
- [135] L.G. Rossato, V.M. Costa, V. Vilas-Boas, M. De Lourdes Bastos, A. Rolo, C. Palmeira, F. Remião, Therapeutic concentrations of mitoxantrone elicit energetic imbalance in H9c2 cells as an earlier event, *Cardiovasc Toxicol*. 13 (2013) 413–425.
<https://doi.org/10.1007/s12012-013-9224-0>.
- [136] U. Takahama, T. Oniki, 3, 4-Dihydroxyphenylalanine is oxidized by phenoxyl radicals of hydroxycinnamic acid esters in leaves of *Vicia faba* L, *J Plant Res*. 111 (1998) 487–494. <https://doi.org/10.1007/BF02507783>.
- [137] L.K. Folkes, L.P. Candeias, Interpretation of the reactivity of peroxidase compounds I and II with phenols by the Marcus equation, *FEBS Lett*. 412 (1997) 305–308.
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00792-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00792-8).
- [138] L.P. Candeias, L.K. Folkes, P. Wardman, Factors Controlling the Substrate Specificity of Peroxidases: Kinetics and Thermodynamics of the Reaction of Horseradish Peroxidase Compound I with Phenols and Indole-3-acetic Acids, *Biochemistry*. 36 (1997) 7081–7085. <https://doi.org/10.1021/BI970384E>.
- [139] J. Soubhye, M. Prévost, P. Van Antwerpen, K. Zouaoui Boudjeltia, A. Rousseau, P.G. Furtmüller, C. Obinger, M. Vanhaeverbeek, J. Ducobu, J. Nève, M. Gelbcke, F. Dufrasne, Structure-Based Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of 3-(Aminoalkyl)-5-fluoroindoles as Myeloperoxidase Inhibitors, *J Med Chem*. 53 (2010) 8747–8759. <https://doi.org/10.1021/jm1009988>.

- [140] J. Soubhye, I. Aldib, B. Elfving, M. Gelbcke, P.G. Furtmüller, M. Podrecca, R. Conotte, J.-M. Colet, A. Rousseau, F. Reye, A. Sarakbi, M. Vanhaeverbeek, J.-M. Kauffmann, C. Obinger, J. Nève, M. Prévost, K. Zouaoui Boudjeltia, F. Dufrasne, P. Van Antwerpen, Design, Synthesis, and Structure–Activity Relationship Studies of Novel 3-Alkylindole Derivatives as Selective and Highly Potent Myeloperoxidase Inhibitors, *J Med Chem.* 56 (2013) 3943–3958. <https://doi.org/10.1021/jm4001538>.
- [141] J.L. Muñoz-Muñoz, F. García-Molina, P.A. García-Ruiz, E. Arribas, J. Tudela, F. García-Cánovas, J.N. Rodríguez-López, Enzymatic and chemical oxidation of trihydroxylated phenols, *Food Chem.* 113 (2009) 435–444. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2008.07.076>.
- [142] C.B. Rasmussen, H.B. Dunford, K.G. Welinder, Rate Enhancement of Compound I Formation of Barley Peroxidase by Ferulic Acid, Caffeic Acid and Coniferyl Alcohol, *Biochemistry.* 34 (1995) 4022–4029. <https://doi.org/10.1021/bi00012a021>.
- [143] J.L. Muñoz, F. García-Molina, R. Varón, J.N. Rodríguez-Lopez, F. García-Cánovas, J. Tudela, Calculating molar absorptivities for quinones: Application to the measurement of tyrosinase activity, *Anal Biochem.* 351 (2006) 128–138. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.01.011>.
- [144] M. Mytnik, Poszukiwanie nowych substratów reakcji Trindera, praca dyplomowa, Uniwersytet Opolski, 2020.
- [145] P.N. Jayaram, G. Roy, G. Mugesh, Effect of thione-thiol tautomerism on the inhibition of lactoperoxidase by anti-thyroid drugs and their analogues, *Journal of Chemical Sciences.* 120 (2008) 143–154. <https://doi.org/10.1007/S12039-008-0017-0/METRICS>.
- [146] G. Roy, M. Nethaji, G. Mugesh, Biomimetic Studies on Anti-Thyroid Drugs and Thyroid Hormone Synthesis, *J Am Chem Soc.* 126 (2004) 2712–2713. https://doi.org/10.1021/JA039860G/SUPPL_FILE/JA039860GSI20040120_092706.PDF.
- [147] G. Roy, G. Mugesh, Anti-Thyroid Drugs and Thyroid Hormone Synthesis: Effect of Methimazole Derivatives on Peroxidase-Catalyzed Reactions, (2005). <https://doi.org/10.1021/ja054497u>.
- [148] G. Roy, D. Das, G. Mugesh, Bioinorganic chemistry aspects of the inhibition of thyroid hormone biosynthesis by anti-hyperthyroid drugs, *Inorganica Chim Acta.* 360 (2007) 303–316. <https://doi.org/10.1016/J.ICA.2006.07.052>.
- [149] X. Tian, K.M. Schaich, Effects of Molecular Structure on Kinetics and Dynamics of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity Assay with ABTS^{•+}, *J Agric Food Chem.* 61 (2013) 5511–5519. <https://doi.org/10.1021/jf4010725>.
- [150] R.B. Walker, J.D. Everette, Comparative reaction rates of various antioxidants with ABTS radical cation, *J Agric Food Chem.* 57 (2009) 1156–1161. <https://doi.org/10.1021/jf8026765>.

- [151] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radic Biol Med.* 26 (1999) 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).
- [152] I.R. Ilyasov, V.L. Beloborodov, I.A. Selivanova, R.P. Terekhov, ABTS/PP Decolorization Assay of Antioxidant Capacity Reaction Pathways, *Int J Mol Sci.* 21 (2020) 1131. <https://doi.org/10.3390/ijms21031131>.
- [153] D. Lim, D. Gründemann, F.P. Seebeck, Total Synthesis and Functional Characterization of Selenoneine, *Angewandte Chemie - International Edition.* 58 (2019) 15026–15030. <https://doi.org/10.1002/anie.201908967>.
- [154] B. Lejczak, P. Kafarski, E. Makowiecka, Phosphonic analogues of tyrosine and 3,4-dihydroxyphenylalanine (dopa) influence mushroom tyrosinase activity, *Biochemical Journal.* 242 (1987) 81–88. <https://doi.org/10.1042/BJ2420081>.
- [155] B. Gąsowska, H. Wojtasek, J. Hurek, M. Dąg, K. Nowak, P. Kafarski, Redox reaction between amino-(3,4-dihydroxyphenyl)methyl phosphonic acid and dopaquinone is responsible for the apparent inhibitory effect on tyrosinase, *Eur J Biochem.* 269 (2002) 4098–4104. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03103.x>.
- [156] D. Tarasek, H. Wojtasek, Rifampicin is not an inhibitor of tyrosinase, *Int J Biol Macromol.* 216 (2022) 830–835. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.07.217>.
- [157] W.M. Chai, M.Z. Lin, F.J. Song, Y.X. Wang, K.L. Xu, J.X. Huang, J.P. Fu, Y.Y. Peng, Rifampicin as a novel tyrosinase inhibitor: Inhibitory activity and mechanism, *Int J Biol Macromol.* 102 (2017) 425–430. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.058>.

Streszczenie

Peroksydaza chrzanowa jest zawierającą hem oksydoreduktazą, która katalizuje reakcje utlenienia różnych związków organicznych używając nadtlenu wodoru jako akceptora elektronów i protonów. W katalitycznym cyklu peroksydacyjnym enzym ten występuje w trzech stanach: stan podstawowy, związek I i związek II. Związek I powstaje po reakcji stanu podstawowego z nadtlakiem wodoru. Związek II powstaje po reakcji związku I z jedną cząsteczką substratu redukującego, a po reakcji z drugą cząsteczką takiego substratu związek II powraca do stanu podstawowego. Enzym ten jest zdolny do utlenienia szerokiej gamy związków, a jego izolacja jest relatywnie prosta. Dlatego peroksydaza chrzanowa znalazła wiele zastosowań praktycznych. Jednym z nich są enzymatyczne testy diagnostyczne służące do oznaczania stężenia wielu ważnych analitów, m.in. kreatyniny, kwasu moczowego, glukozy, cholesterolu czy trójglicerydów. W testach tych peroksydaza chrzanowa katalizuje tak zwaną reakcję Trindera, która obejmuje oksydacyjne sprzężenie 4-aminoantypiryny i fenolu lub jego pochodnych. Rezultatem tej reakcji jest powstanie chromoforu o absorpcji przy około 500 nm, co pozwala na spektrofotometryczne oznaczanie stężenia analitów. Od czasu wprowadzenia tej metody do diagnostyki medycznej wykryto wiele związków wpływających na uzyskiwane wyniki. Jednak mechanizmy tych zakłóceń zostały ustalone tylko w nielicznych przypadkach.

W rozprawie wyjaśniono mechanizmy zakłóceń reakcji Trindera przez kilka grup związków. Wykazano, że w przypadku *p*-difenoli wielkość zakłóceń zależy od właściwości elektrochemicznych związków (potencjału redukcyjnego) będących konsekwencją ich struktury. Kwas homogentyzynowy (kwas 2,5-dihydroksyfenylooctowy) wykazał najsilniejszy efekt zakłócający, co wynikało z jego bezpośredniego utlenienia przez peroksydazę chrzanową i redukcji rodnikowych produktów pośrednich reakcji Trindera z fenolem jako substratem. Dla kwasu gentyzynowego (2,5-dihydroksybenzoesowego), dobessilanu wapnia i etamsylatu (soli kwasu 2,5-dihydroksybenzenosulfonowego) tylko ten drugi mechanizm miał istotne znaczenie i wpływ na reakcję Trindera był umiarkowany. Dodatkowo sprawdzono wpływ kwasu homogentyzynowego i dobessilanu wapnia na warianty reakcji Trindera zawierające 3,5-dichloro-2-hydroksybenzenosulfonian sodu lub kwas 3-hydroksy-2,4,6-trijodobenzoesowy, które są gorszymi substratami peroksydazy chrzanowej niż fenol. W tych układach wpływ badanych *p*-difenoli był silniejszy. Sprawdzono również wpływ bardziej złożonych leków z ugrupowaniem *p*-difenolowym: ryfampicyny, mitoksantronu i doksorubicyny oraz *p*-aminofenolu: mesalazyny. Spośród tych związków jedynie mesalazyna

wykazywała umiarkowane zakłócenia reakcji Trindera, a dla pozostałych związków efekt był niewielki. Jednak w testach diagnostycznych zakłócenia te nie powinny mieć znaczenia, ponieważ stężenia tych związków osiągnane w płynach fizjologicznych w standardowych warunkach są zbyt niskie.

Zweryfikowano także mechanizmy zakłóceń testów diagnostycznych opartych na reakcji Trindera przez dopaminę i dobutaminę, lek stosowany w regulacji pracy serca. Wykazano, że obydwie związki w wyniku utlenienia przez peroksydazę chrzanową tworzą chromofory typu aminochromu. W celu wyjaśnienia przyczyny różnych szybkości utlenienia tych dwóch związków zsyntezowano pochodną dobutaminy z grupą fenolową zablokowaną przez metylację. Analiza kinetyczna oraz dokowanie molekularne tych trzech związków do centrum aktywnego peroksydazy chrzanowej pozwoliły stwierdzić, że szybsze utlenienie grupy katecholowej w dobutaminie niż dopaminie jest konsekwencją dwóch procesów: 1) szybszego utlenienia grupy fenolowej dobutaminy, która jest połączona z grupą aminową dłuższym łańcuchem alkilowym niż grupa katecholowa a powstający rodnik fenoksylowy pośredniczy w utlenieniu grupy katecholowej, 2) utrudnionego dostępu grupy katecholowej dopaminy do centrum katalitycznego spowodowanego zakotwiczeniem jej grupą aminową w pobliżu wejścia do centrum katalitycznego, co odzwierciedla dużo większą wartość K_m dopaminy niż dobutaminy.

Zweryfikowano także doniesienie o inhibicji peroksydazy chrzanowej w teście do oznaczania kwasu moczowego przez kwas galusowy i hispidynę, będąca pochodną kwasu kawowego. Wykazano, że w warunkach tego testu kwas galusowy, kwas kawowy i hispidyna są szybko utleniane do niestabilnych produktów. Reakcje te hamują powstawanie produktów reakcji Trindera, a więc obniżają wartości absorbancji mierzonej w tym teście. Stwierdzono, że podobne zjawisko miało miejsce również w przypadku selenowych pochodnych metimazolu w reakcjach utlenienia ABTS przez laktoperoksydazę. Wygenerowano kationorodnik ABTS przez utlenienie nadsiarczanem sodu i dodano do niego selenowe analogi metimazolu. Absorbancja tak wygenerowanego rodnika spadała gwałtownie w obecności tych związków, a więc związki te redukują jedynie kationorodnik ABTS i nie są inhibitorami laktoperoksydazy. Analizując przebieg reakcji za pomocą spektroskopii NMR i wysokorozdzielczej spektroskopii mas zidentyfikowano produkty tych reakcji i ustalono ścieżkę przemian selenowej pochodnej metimazolu.

Abstract

Horseradish peroxidase is an oxidoreductase that contains heme and catalyzes oxidation of various organic compounds using hydrogen peroxide as an acceptor of electrons and protons. In the peroxidative catalytic cycle the enzyme exists in three states: the ground state, compound I, and compound II. Compound I is formed after reaction of the ground state with hydrogen peroxide. Compound II is formed upon reaction of compound I with one molecule of a reducing substrate, and upon reaction with a second molecule of such a substrate, compound II returns to the ground state. Horseradish peroxidase is capable of oxidizing a wide range of compounds, and its isolation is relatively simple. Therefore, it found many practical applications, including enzymatic diagnostic tests used to determine the concentration of many important analytes, such as creatinine, uric acid, glucose, cholesterol, and triglycerides. In these assays, horseradish peroxidase catalyzes the Trinder reaction, which involves the oxidative coupling of 4-aminoantipyrine and phenol or its derivatives. The result of this reaction is the formation of a chromophore with absorption at approximately 500 nm, which enables spectrophotometric determination of the concentration of analytes. Since the introduction of this method into medical diagnostics its interference by many compounds has been detected. However, the mechanisms of these interferences have only been established in a few cases.

The dissertation explains the mechanisms of interference of the Trinder reaction by several groups of compounds. It has been demonstrated that in the case of *p*-diphenols the magnitude of interference depends on the electrochemical properties of compounds (reduction potential) which result from their structure. Homogentisic acid (2,5-dihydroxyphenylacetic acid) had the strongest interfering effect, which resulted from its direct oxidation by horseradish peroxidase and reduction of radical intermediates of the Trinder reaction with phenol as a substrate. For gentisic acid (2,5-dihydroxybenzoic acid), calcium dobesilate, and etamsylate (salts of 2,5-dihydroxybenzenesulfonic acid) only the latter mechanism was significant and the effect on the Trinder reaction was moderate. Additionally, the effect of homogentisic acid and calcium dobesilate on variants of the Trinder reaction containing sodium 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonate or 3-hydroxy-2,4,6-triiodobenzoic acid, which are worse substrates of horseradish peroxidase than phenol, was checked. The influence of the tested *p*-diphenols was stronger in these systems. The effect of more complex drugs containing a *p*-diphenol group, such as rifampicin, mitoxantrone, and doxorubicin, and a *p*-aminophenol, such as mesalazine, was also tested. Among these compounds, only mesalazine showed moderate interference with the Trinder reaction, and for the remaining compounds, the effect was small.

However, in diagnostic tests these interferences should not be significant because the concentrations of these compounds achieved in physiological fluids under standard conditions are too low.

Mechanisms of interference in Trinder-based diagnostic tests by dopamine and dobutamine, a drug used to regulate the work of the heart, were also verified. It was shown that both compounds form aminochrome-type chromophores as a result of their oxidation by horseradish peroxidase. To explain the different oxidation rates of the catechol groups in these two compounds, a dobutamine derivative with a phenolic group blocked by methylation was synthesized. Kinetic analysis and molecular docking of these three compounds to the active site of horseradish peroxidase led to the conclusion that the faster oxidation of the catechol group in dobutamine than in dopamine was caused by two processes: 1) faster oxidation of the phenolic group of dobutamine, which is connected to the amino group by a longer alkyl chain than the catechol group, and the emerging phenoxy radical mediates the oxidation of the catechol group, 2) hindered access of the dopamine catechol group to the catalytic center caused by its anchoring with an amino group near the entrance to the catalytic center, which is reflected in the much higher K_m value of dopamine than dobutamine.

Inhibition of horseradish peroxidase observed in the test for the determination of uric acid by gallic acid and hispidin, a derivative of caffeic acid, was also verified. Gallic acid, caffeic acid and hispidin have been shown to be rapidly oxidized to unstable products under the conditions of this test. These reactions inhibit the formation of the Trinder reaction chromophore and thus reduce the absorbance values measured in this test. It was found that a similar phenomenon also took place also in the case of selenium analogs of methimazole during oxidation of ABTS by lactoperoxidase. ABTS cation radical was generated by oxidation with sodium persulfate and selenium analogs of methimazole were added to it. The absorbance of the radical generated in this way decreased rapidly in the presence of these compounds. Therefore they only reduce the ABTS cation radical and are not lactoperoxidase inhibitors. By analyzing the course of the reaction with NMR spectroscopy and high-resolution mass spectroscopy the products of these reactions were identified and the pathway of transformation of the selenium analogs of methimazole was determined.

Tabela D1. Porównanie szybkości reakcji Trindera z fenolem jako substratem bez badanych prostych *p*-difenoli i w ich obecności. Szybkość reakcji została obliczona na podstawie wyników zużycia nadtlenu wodoru w czasie pierwszej minuty reakcji. Szybkości reakcji, które są statystycznie różne od szybkości reakcji kontrolnej zaznaczone są gwiazdką (Test Studenta, $p < 0,01$).

Związek	Stężenie (μM)	Szybkość reakcji ($\mu\text{M}/\text{min}$)	Odchylenie standardowe ($\mu\text{M}/\text{min}$)
Kwas homogentyzynowy	0	8,5	0,3
	20	9,2	1,3
	40	9,9	1,8
	60	12,4*	1,0
	80	13,9*	1,2
Kwas gentyzynowy	0	7,3	0,8
	20	7,1	2,0
	40	6,6	0,7
	60	6,5	0,8
	80	7,1	1,2
Dobesilan wapnia	0	7,6	0,3
	20	8,4	0,5
	40	7,1	0,6
	60	8,3	1,0
	80	7,3	1,0
Etamsylat	0	8,2	0,4
	20	8,9	1,0
	40	7,8	0,5
	60	8,1	0,7
	80	7,8	0,4

Tabela D2. Porównanie szybkości reakcji Trindera z kwasem 3-hydroksy-2,4,6-trijodobenzoowym jako substratem bez badanych prostych *p*-difenoli i w ich obecności. Szybkość reakcji została obliczona na podstawie wyników zużycia nadtlenu wodoru w czasie pierwszej minuty reakcji. Szybkości reakcji, które są statystycznie różne od szybkości reakcji kontrolnej zaznaczone są gwiazdką (Test Studenta, $p < 0,01$).

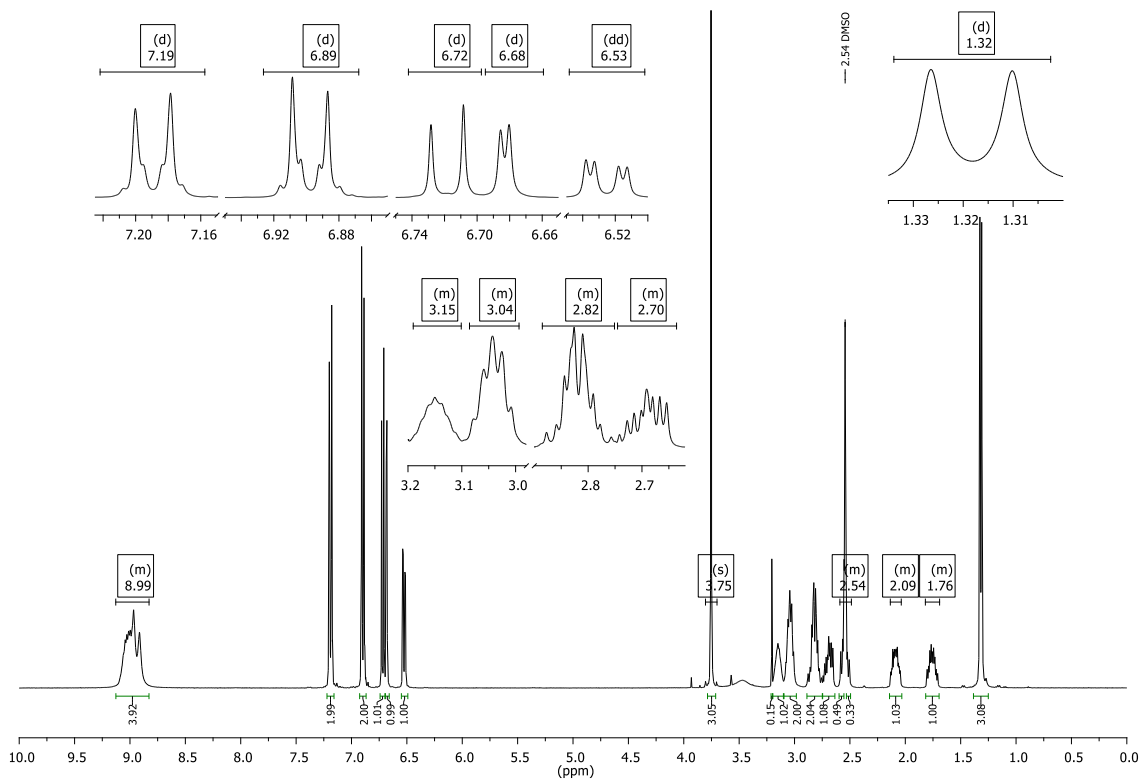
Związek	Stężenie (μM)	Szybkość reakcji ($\mu\text{M}/\text{min}$)	Odchylenie standardowe ($\mu\text{M}/\text{min}$)
Kwas homogentyzynowy	0	10,8	0,4
	20	14,8*	0,8
	40	20,4*	1,7
	60	23,0*	0,6
	80	30,0*	1,2
Kwas gentyzynowy	0	7,7	1,6
	20	9,3	1,5
	40	12,5	2,5
	60	10,0	1,8
	80	9,6	0,9

Tabela D3. Porównanie szybkości reakcji Trindera z 3,5-dichloro-2-hydroksybenzeno-sulfonianem sodu jako substratem bez badanych prostych *p*-difenoli i w ich obecności. Szybkość reakcji została obliczona na podstawie wyników zużycia nadtlenu wodoru w czasie pierwszej minuty reakcji. Szybkości reakcji, które są statystycznie różne od szybkości reakcji kontrolnej zaznaczone są gwiazdką (Test Studenta, $p < 0,01$).

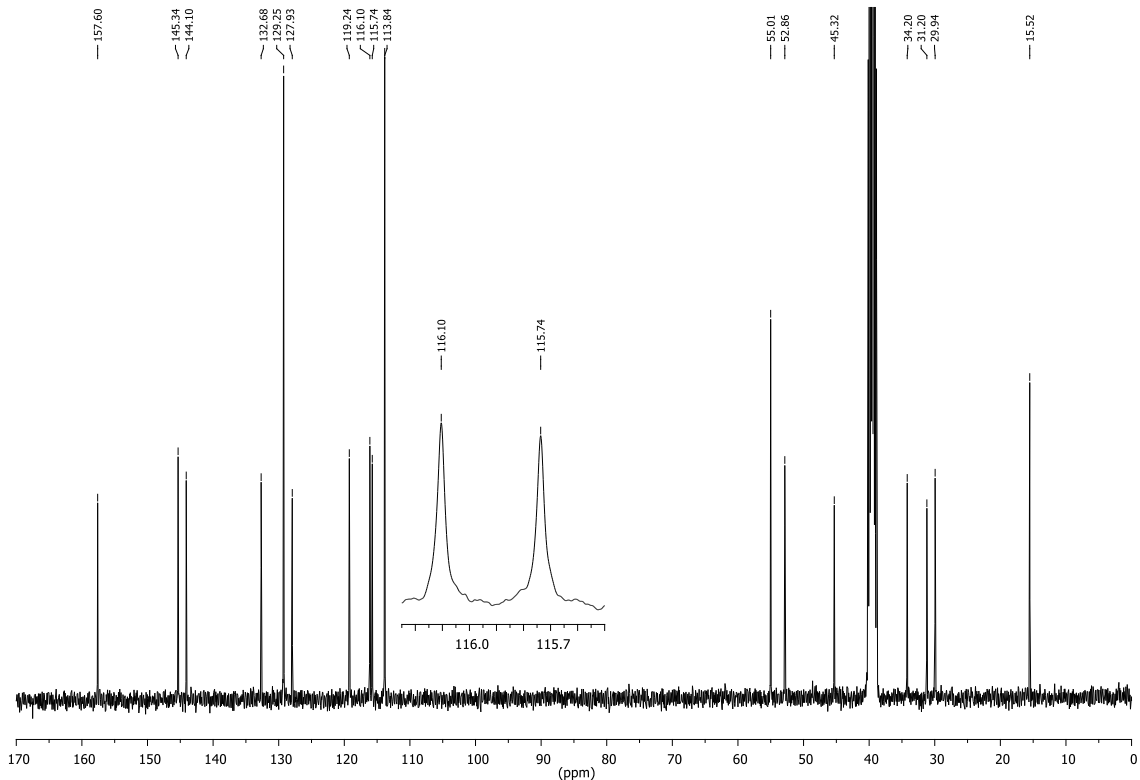
Związek	Stężenie (μM)	Szybkość reakcji ($\mu\text{M}/\text{min}$)	Odchylenie standardowe ($\mu\text{M}/\text{min}$)
Kwas homogentyzynowy	0	6,3	0,2
	20	12,2*	1,1
	40	17,8*	1,1
	60	22,6*	0,7
	80	29,8*	1,7
Kwas gentyzynowy	0	6,7	1,1
	20	8,3	1,1
	40	8,8	1,5
	60	7,4	1,5
	80	8,3	1,0

Tabela D4. Szybkości utlenienia badanych prostych *p*-difenoli przez peroksydazę chrzanową. Szybkości reakcji zostały obliczone na podstawie wyników zużycia nadtlenu wodoru w czasie pierwszej minuty reakcji.

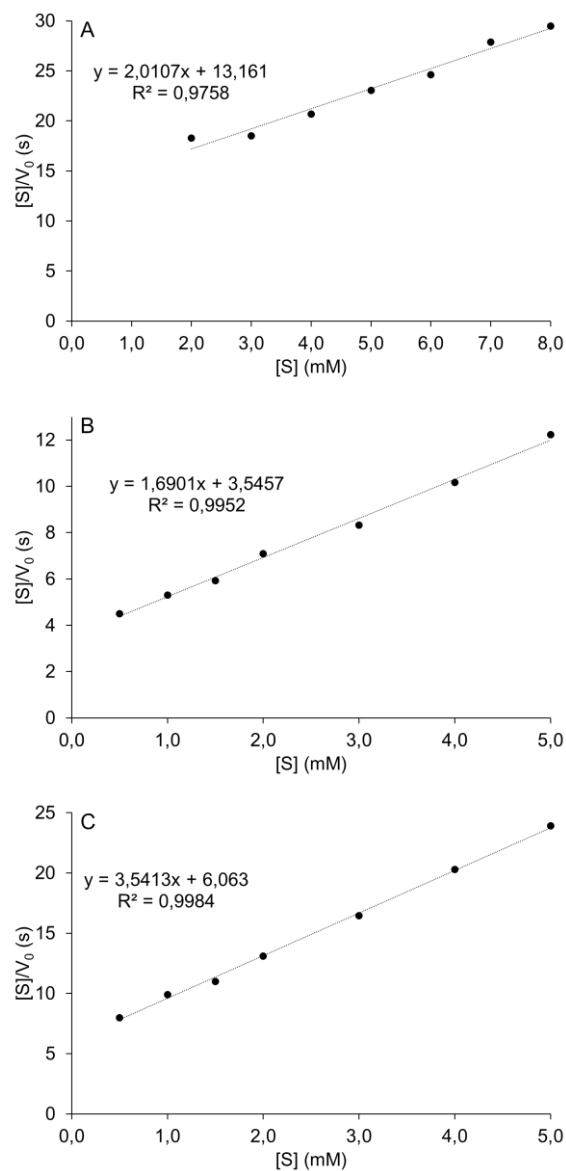
Związek	Stężenie (μM)	Stężenie HRP ($\mu\text{g}/\text{ml}$, U/ml)	Szybkość reakcji ($\mu\text{M}/\text{min}$)	Odchylenie standardowe ($\mu\text{M}/\text{min}$)
Kwas homogentyzynowy	50	0,4 (0,08)	3,6	0,5
		2,0 (0,4)	17,8	0,1
	100	0,4 (0,08)	6,4	1,4
		2,0 (0,4)	35,1	1,5
Kwas gentyzynowy	50	0,4 (0,08)	3,2	0,8
		2,0 (0,4)	5,2	0,7
	100	0,4 (0,08)	1,7	0,3
		2,0 (0,4)	1,2	0,9
Dobesilan wapnia	50	0,4 (0,08)	1,7	0,5
		2,0 (0,4)	3,8	1,1
	100	0,4 (0,08)	3,6	0,5
		2,0 (0,4)	17,8	0,1
Etamsylat	50	0,4 (0,08)	6,4	1,4
		2,0 (0,4)	35,1	1,5
	100	0,4 (0,08)	3,2	0,8
		2,0 (0,4)	5,2	0,7



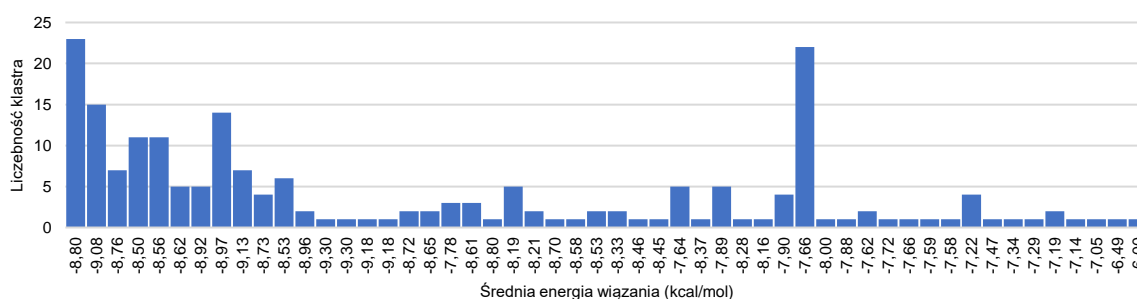
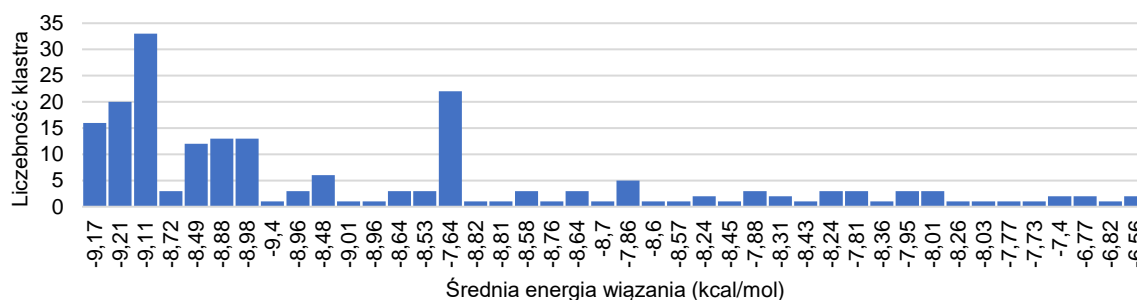
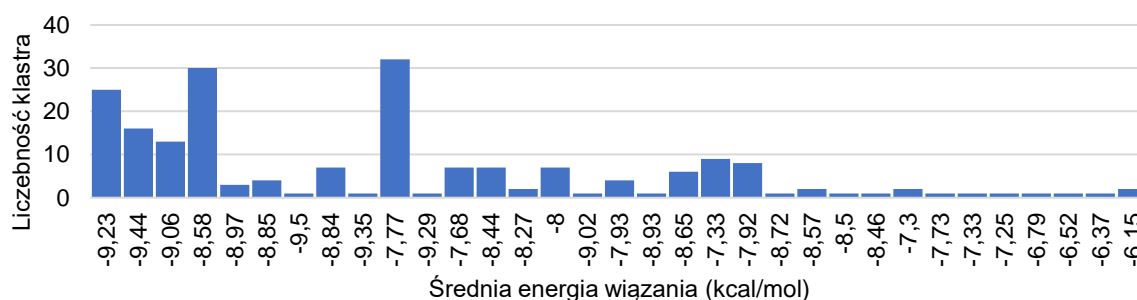
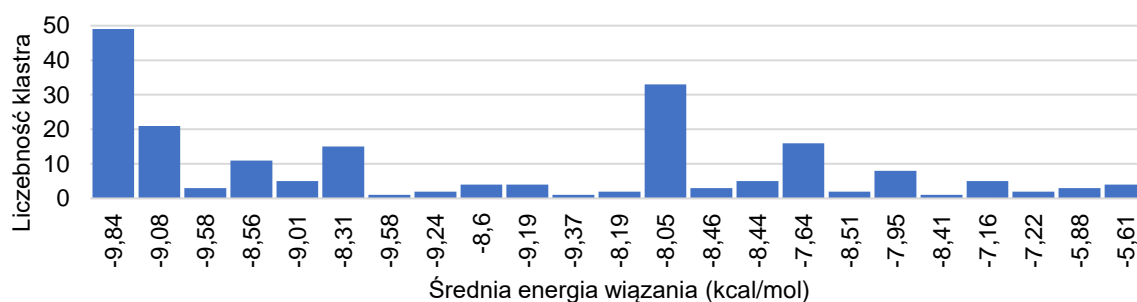
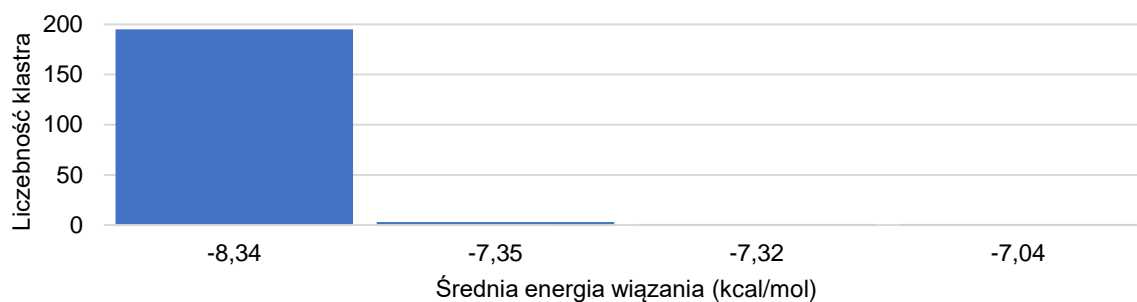
Rysunek D3. Widmo ^1H NMR metylowanej pochodnej dobutaminy (4-(2-[[4-(4-metoksyfeno)butan-2-ylo]amino]etylo)-benzeno-1,2-diolu) w DMSO-D_6 .



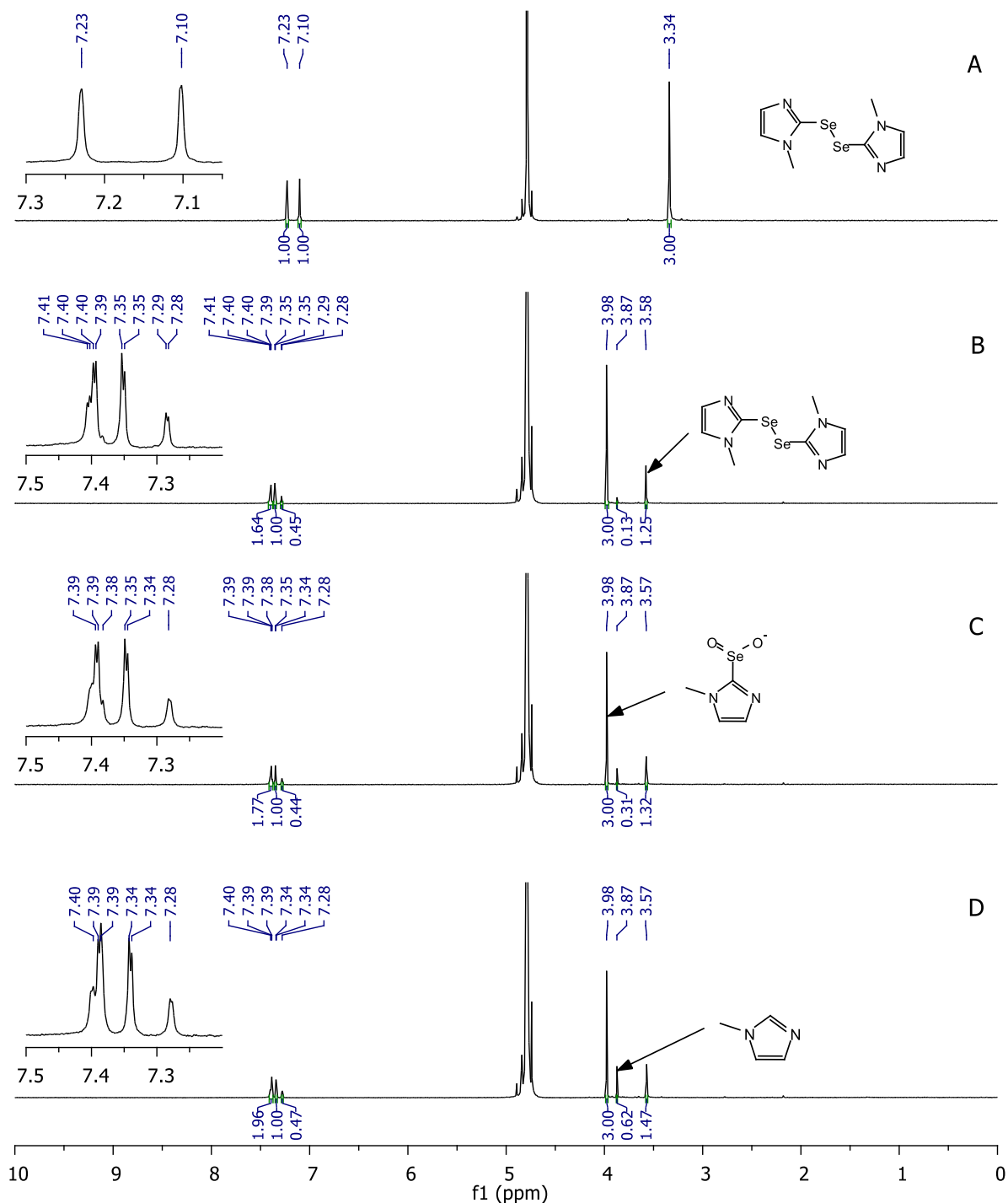
Rysunek D4. Widmo ^{13}C NMR metylowanej pochodnej dobutaminy (4-(2-[[4-(4-metoksyfeno)butan-2-ylo]amino]etylo)-benzeno-1,2-diolu) w DMSO-D_6 .



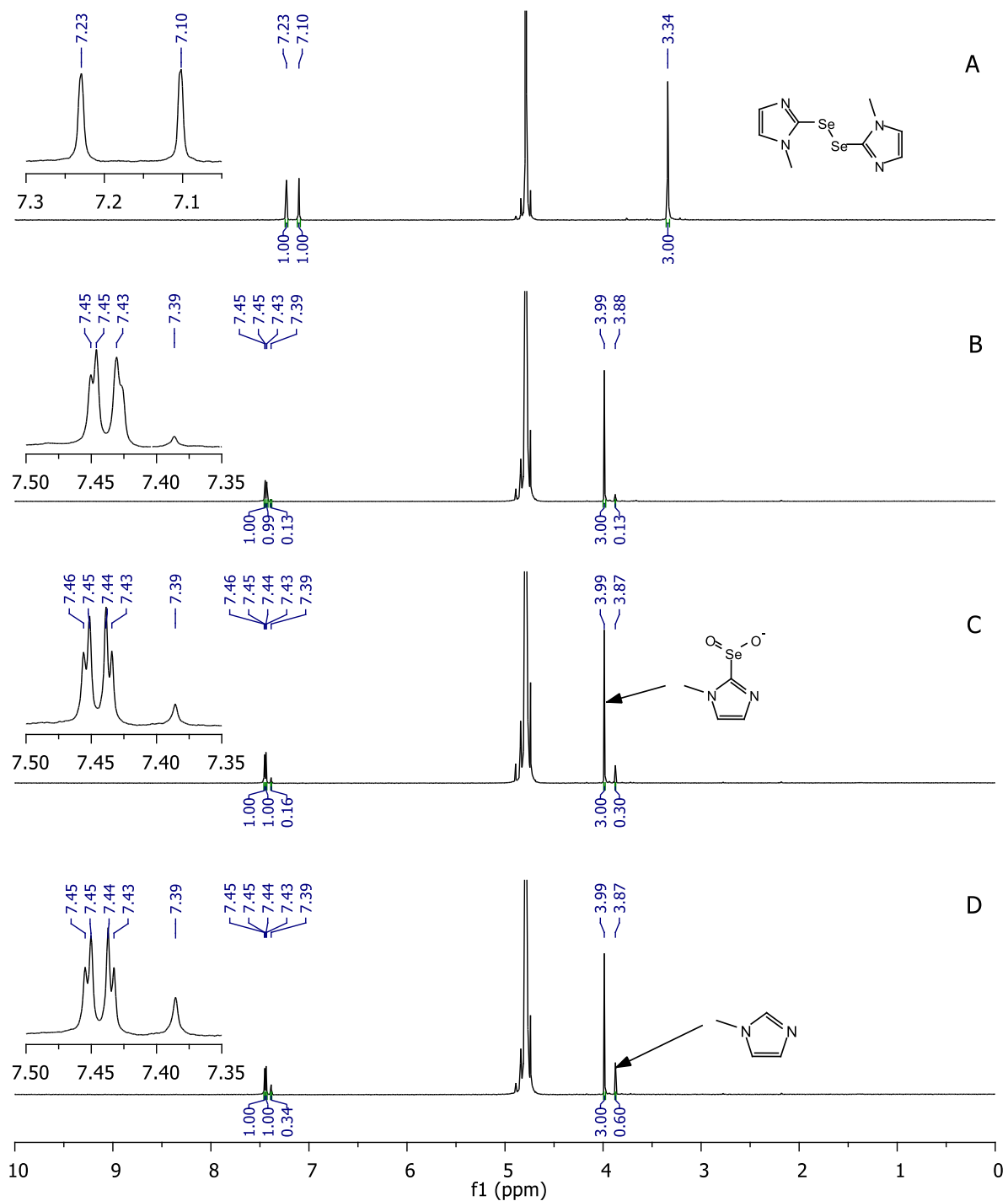
Rysunek D5. Wykresy Hanesa-Woolfa, na podstawie których wyznaczono parametry kinetyczne (K_m i V_{max}) reakcji utlenienia: A – dopaminy, B – dobutaminy, C – metylowanego analogu dobutaminy.



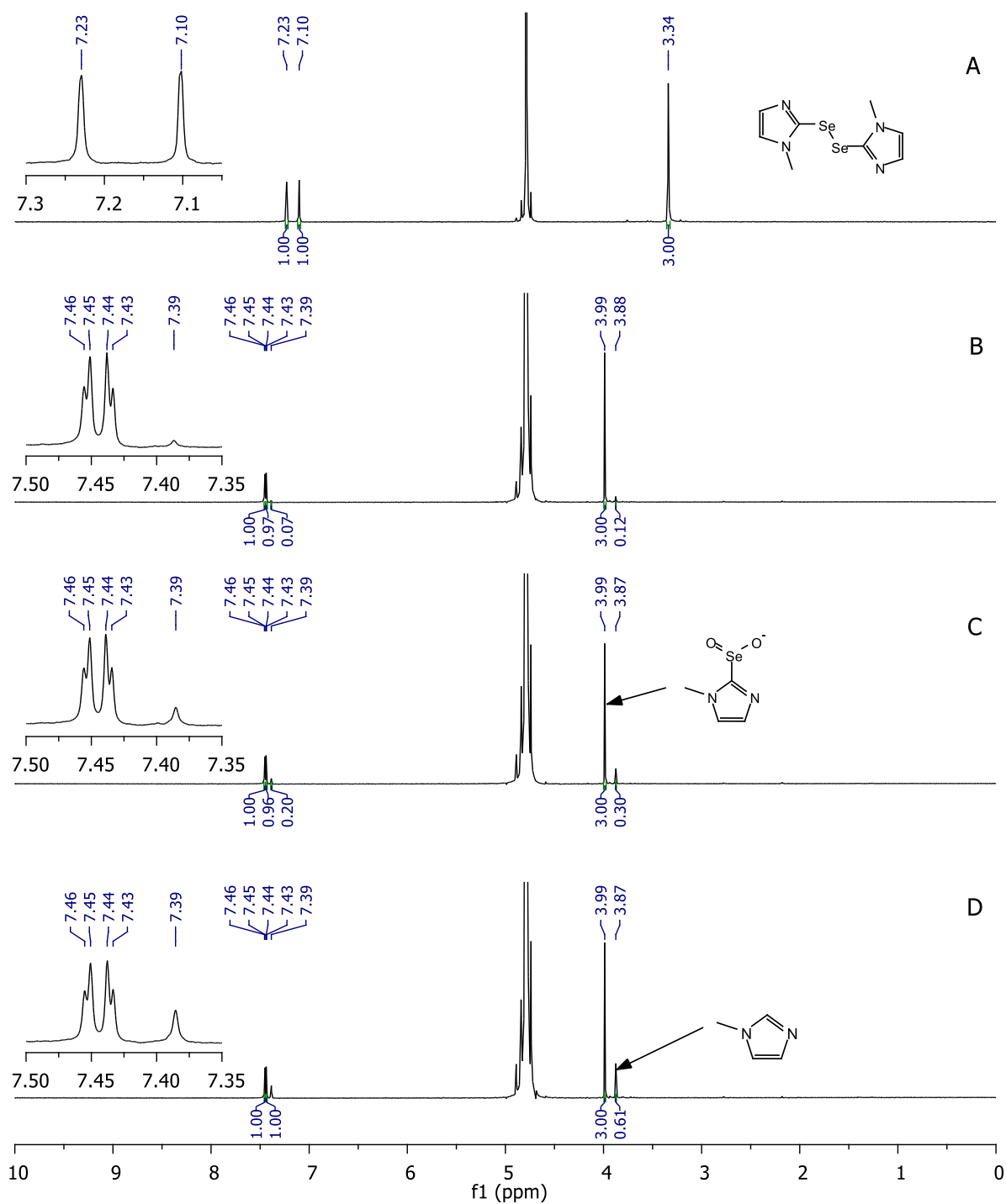
Rysunek D6. Histogram klastrów uzyskanych w wyniku dokowania: A – dopaminy, B – *R*-dobutaminy, C – *S*-dobutaminy, D – metylowanej pochodnej *R*-dobutaminy, E – metylowanej pochodnej *S*-dobutaminy.



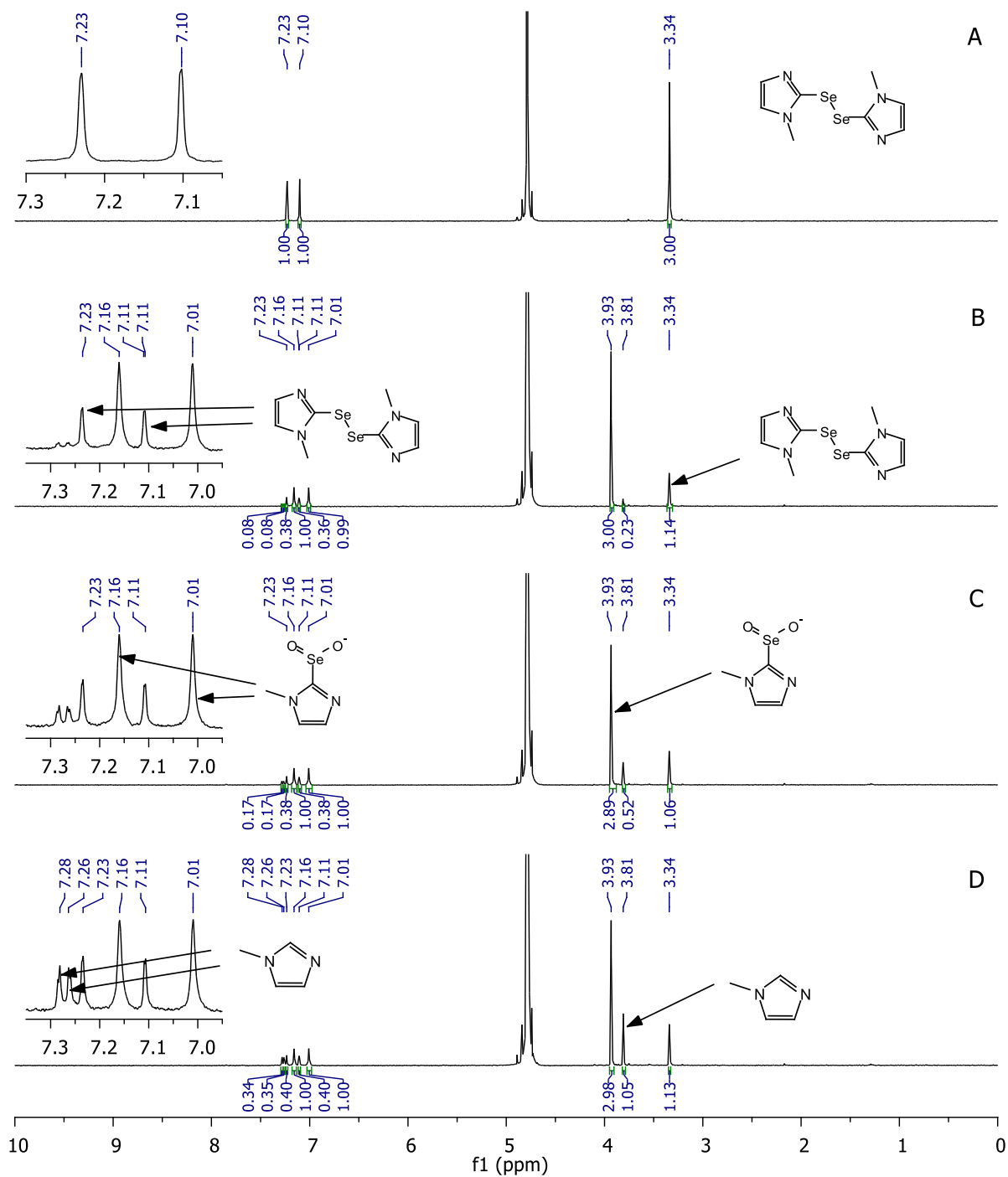
Rysunek D7. Widma ¹H NMR zarejestrowane w czasie reakcji utlenienia ABTS i 1,2-bis(1-metylo-1H-imidazol-2-ylo)diselenidu przez HRP w wodzie. Mieszanka reakcyjna zawierała 5 mM badany związek, 10 mM H₂O₂ (2 równoważniki), 100 μM ABTS i 100 μg/ml (20 U/ml) HRP w D₂O. Widma zarejestrowano dla samego związku (A), po 10 (B), 30 (C) i 60 minutach (D) reakcji zainicjowanej dodatkiem H₂O₂. Z powodu nakładania się sygnałów w regionie aromatycznym nie zostały one przypisane.



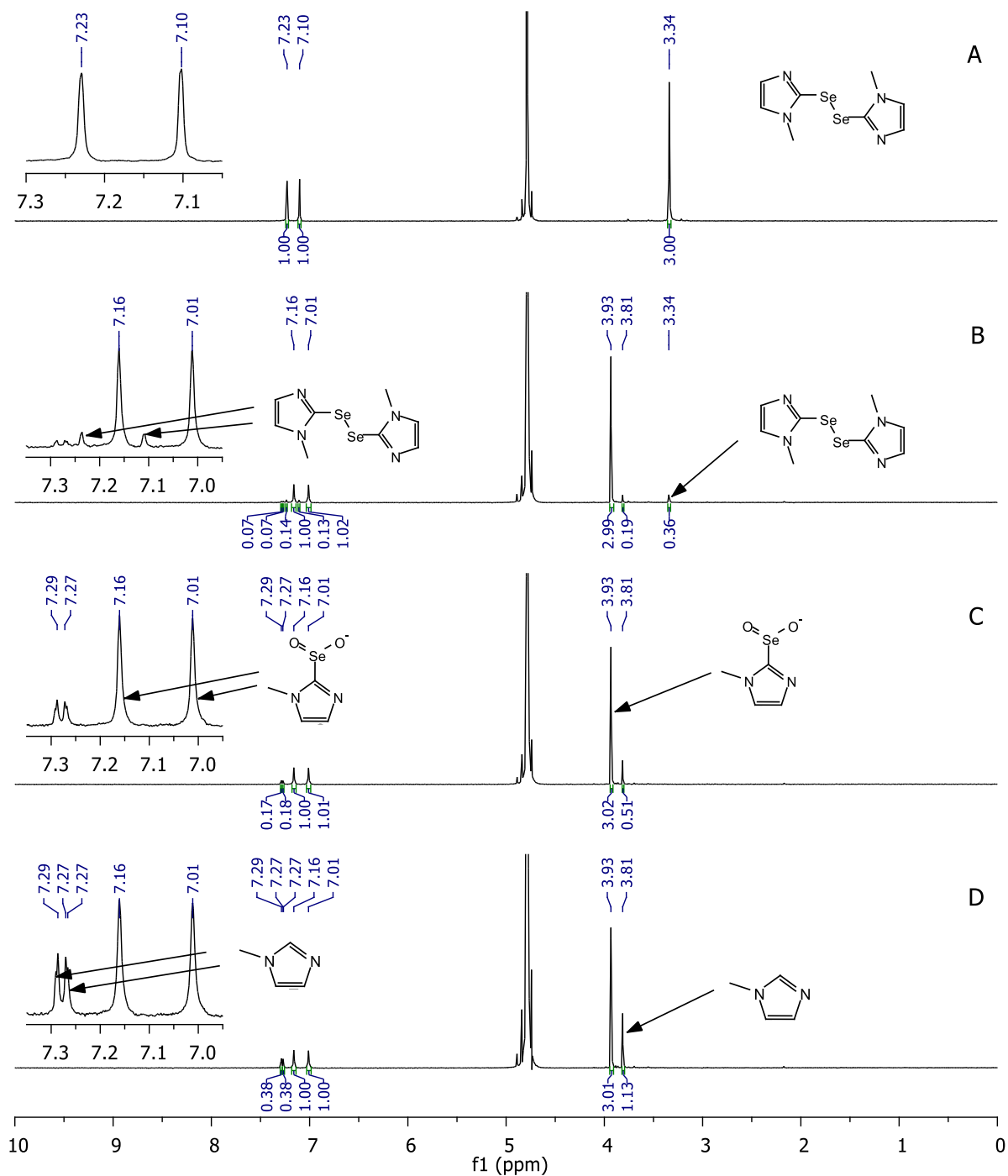
Rysunek D8. Widma ¹H NMR zarejestrowane w czasie reakcji utlenienia ABTS i 1,2-bis(1-metylo-1H-imidazol-2-ylo)diselenidu przez HRP w wodzie. Mieszanka reakcyjna zawierała 5 mM badany związek, 15 mM H₂O₂ (3 równoważniki), 100 μM ABTS i 100 μg/ml (20 U/ml) HRP w D₂O. Widma zarejestrowano dla samego związku (A), po 10 (B), 30 (C) i 60 minutach (D) reakcji zainicjowanej dodatkiem H₂O₂. Z powodu nakładania się sygnałów w regionie aromatycznym nie zostały one przypisane.



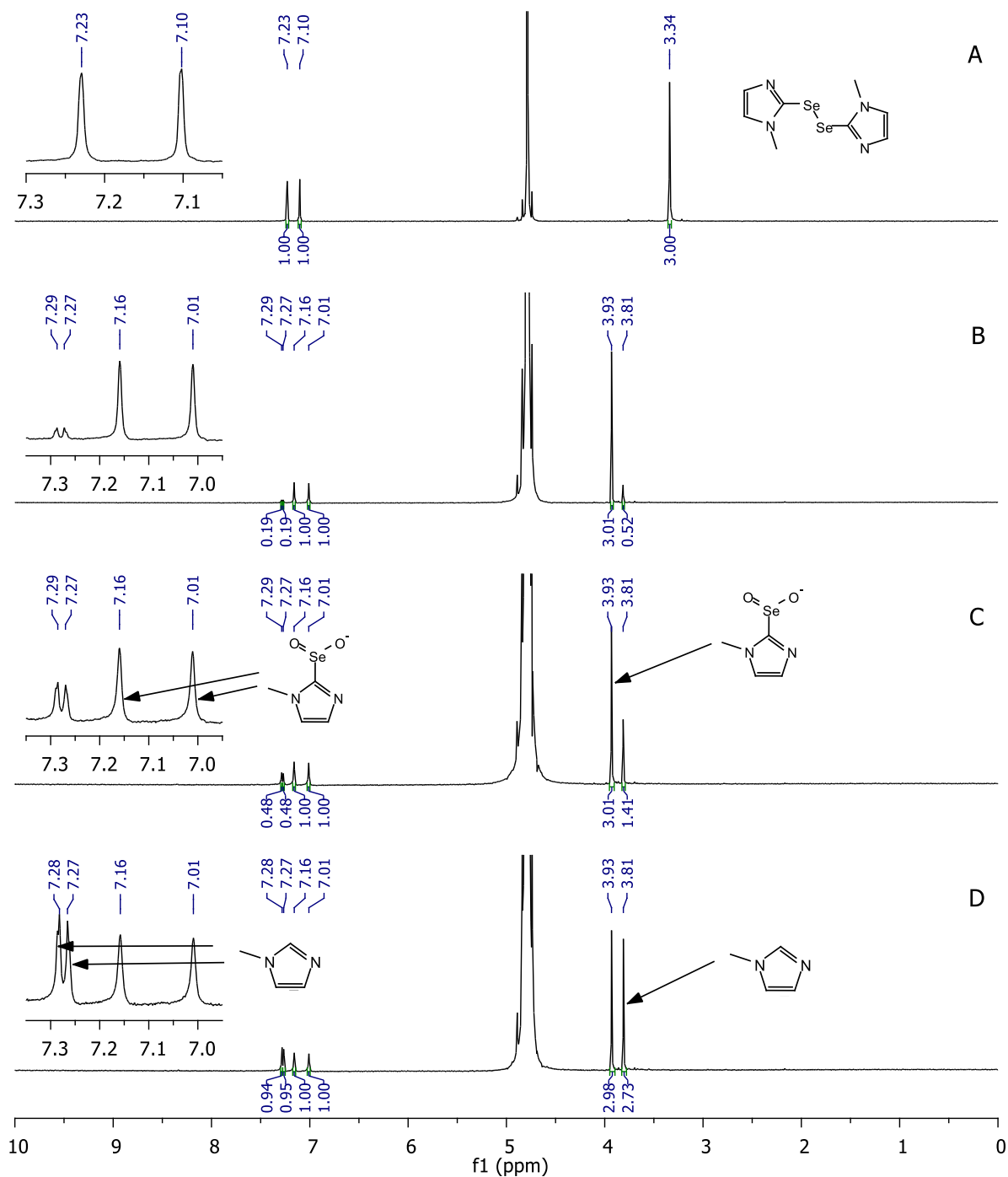
Rysunek D9. Widma ^1H NMR zarejestrowane w czasie reakcji utlenienia ABTS i 1,2-bis(1-metylo-1H-imidazol-2-ylo)diselenidu przez HRP w wodzie. Mieszanka reakcyjna zawierała 5 mM badany związek, 25 mM H_2O_2 (5 równoważników), 100 μM ABTS i 100 $\mu\text{g/ml}$ (20 U/ml) HRP w D_2O . Widma zarejestrowano dla samego związku (A), po 10 (B), 30 (C) i 60 minutach (D) reakcji zainicjowanej dodatkiem H_2O_2 . Z powodu nakładania się sygnałów w regionie aromatycznym nie zostały one przypisane.



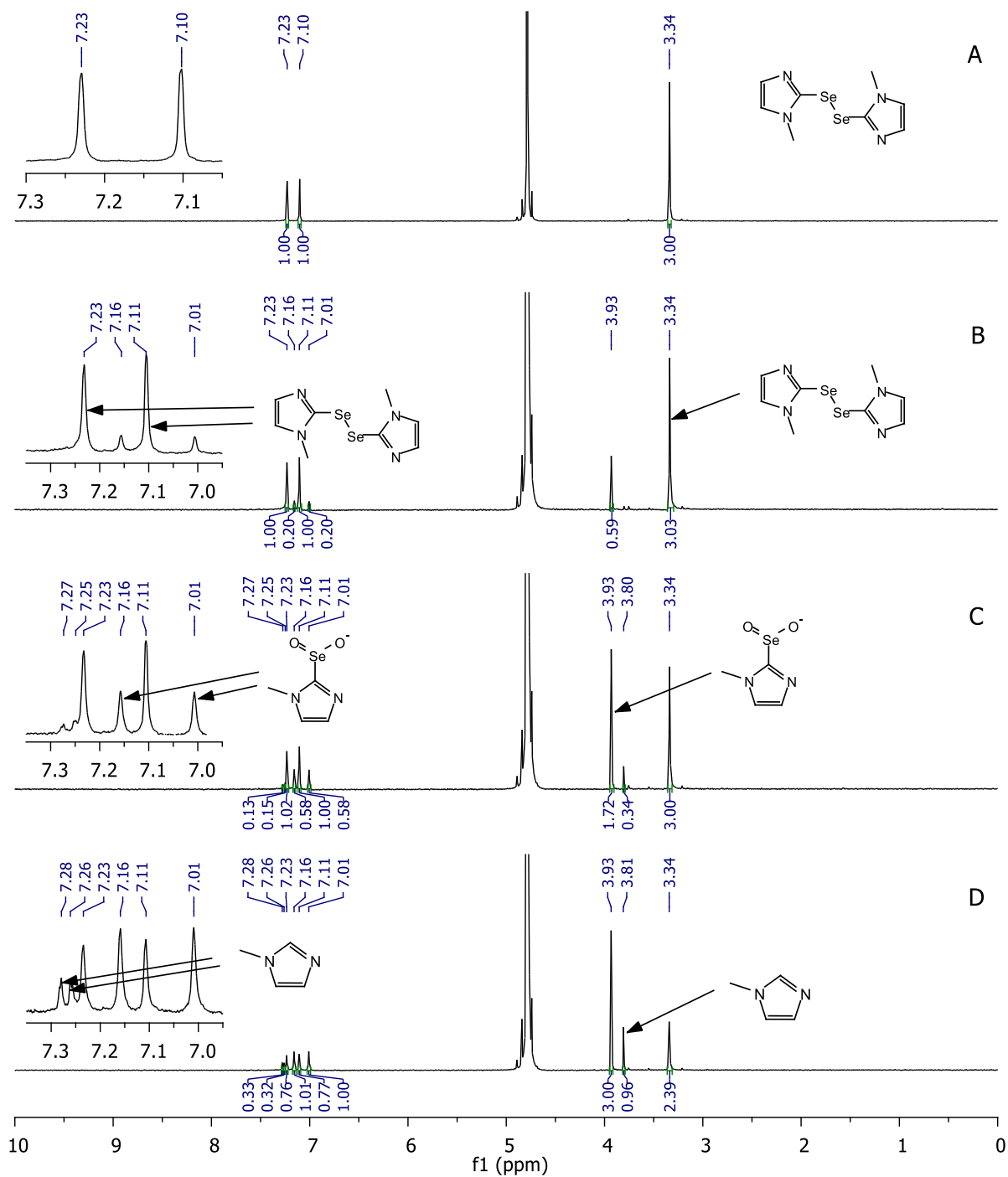
Rysunek D10. Widma ¹H NMR zarejestrowane w czasie reakcji utlenienia ABTS i 1,2-bis(1-metylo-1H-imidazol-2-ylo)diselenidu przez HRP. Mieszana reakcyjna zawierała 5 mM badany związek, 10 mM H₂O₂ (2 równoważniki), 100 μM ABTS i 100 μg/ml (20 U/ml) HRP w 100 mM buforze fosforanowy o pH 7,0. Widma zarejestrowano dla samego związku (A), po 10 (B), 30 (C) i 60 minutach (D) reakcji zainicjowanej dodatkiem H₂O₂.



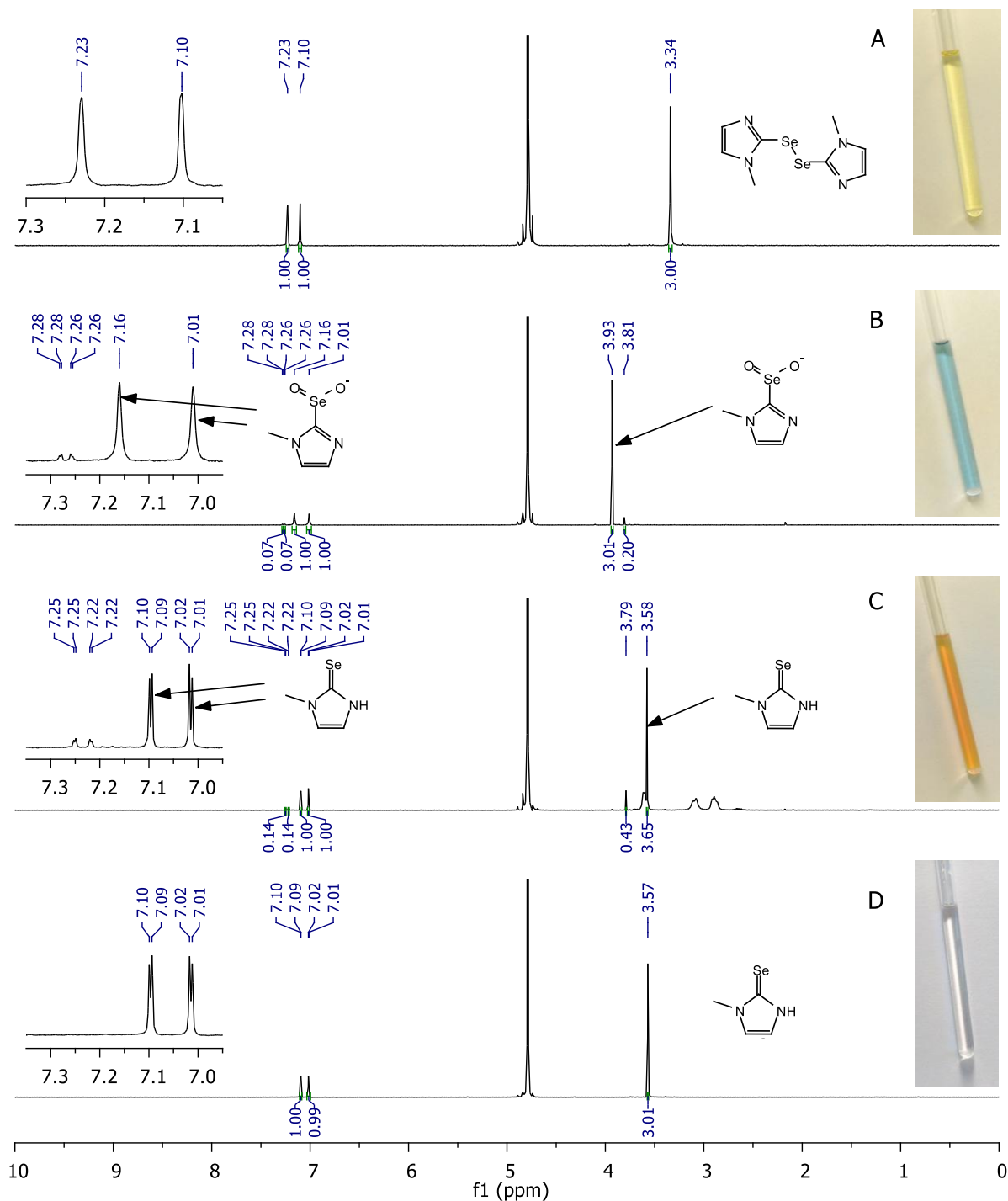
Rysunek D11. Widma ¹H NMR zarejestrowane w czasie reakcji utlenienia ABTS i 1,2-bis(1-metylo-1*H*-imidazol-2-ylo)diselenidu przez HRP. Mieszana reakcyjna zawierała 5 mM badany związek, 15 mM H₂O₂ (3 równoważniki), 100 μM ABTS i 100 μg/ml (20 U/ml) HRP w 100 mM buforze fosforanowy o pH 7,0. Widma zarejestrowano dla samego związku (A), po 10 (B), 30 (C) i 60 minutach (D) reakcji zainicjowanej dodatkiem H₂O₂.



Rysunek D12. Widma ^1H NMR zarejestrowane w czasie reakcji utlenienia ABTS i 1,2-bis(1-metylo-1H-imidazol-2-ylo)diselenidu przez HRP. Mieszanina reakcyjna zawierała 5 mM badany związek, 25 mM H_2O_2 (5 równoważników), 100 μM ABTS i 100 $\mu\text{g/ml}$ (20 U/ml) HRP w 100 mM buforze fosforanowy o pH 7,0. Widma zarejestrowano dla samego związku (A), po 10 (B), 30 (C) i 60 minutach (D) reakcji zainicjowanej dodatkiem H_2O_2 .



Rysunek D13. Widma ^1H NMR zarejestrowane w czasie reakcji utlenienia 1,2-bis(1-metylo-1*H*-imidazol-2-ylo)diselenidu przez HRP. Mieszanina reakcyjna zawierała 5 mM badany związek, 15 mM H_2O_2 (3 równoważniki) w 100 mM buforze fosforanowy o pH 7,0. Widma zarejestrowano dla samego związku (A), po 10 (B), 60 (C), i 120 minutach (D) reakcji zainicjowanej dodatkiem H_2O_2 .



Rysunek D14. Widma ^1H NMR produktów redukcji utlenionego 1,2-bis(1-metylo-1H-imidazol-2-ylo)diselenidu przez DTT. Badany związek (5 mM, A) inkubowano z $15\text{ mM H}_2\text{O}_2$ (3 równoważniki), $100\text{ }\mu\text{M}$ ABTS i $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ (20 U/ml) HRP w 100 mM buforze fosforanowym o pH 7,0 przez 10 minut (B). Następnie dodano DTT aby uzyskać końcowe stężenie 25 mM i od razu zarejestrowano widmo (C). Widmo 1-metylo-1,3-dihydro-2H-imidazo[2,1-b]selenolu pokazane jest dla porównania (D). Wstawki zawierają zdjęcia próbek.

Dorobek naukowy

Publikacje w czasopismach naukowych z zakresu tematyki rozprawy doktorskiej

1. Damian Tarasek, Hubert Wojtasek, Khedidja Benarous, Mohamed Yousfi, „In vitro oxidation of hispidin and gallic acid by horseradish peroxidase”, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* **41** (2023) 2321–2325
2. Damian Tarasek, Beata Gąsowska-Bajger, Bożena Frąckowiak-Wojtasek, Christian Kersten, Michał Jewgiński, Łukasz Kołodziej, Rafał Latajka, Hubert Wojtasek, „Oxidation of dobutamine and dopamine by horseradish peroxidase”, *Journal of Molecular Structure* **1252** (2022) 132169
3. Damian Tarasek, Beata Gąsowska-Bajger, Hubert Wojtasek, „Mechanisms of interference of *p*-diphenols with Trinder reaction”, *Bioorganic Chemistry* **97** (2020) 103692.

Publikacja w czasopismach naukowych spoza tematyki rozprawy doktorskiej

1. Damian Tarasek, Hubert Wojtasek, „Rifampicin is not an inhibitor of tyrosinase”, *International Journal of Biological Macromolecules* **216** (2022) 830–835

Udział w ogólnopolskich konferencjach naukowych z wystąpieniem ustnym

1. Damian Tarasek, Beata Gąsowska-Bajger, Hubert Wojtasek, „Różnice w utlenieniu dopaminy i dobutaminy przez peroksydazę chrzanową”, VIII Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii, Łódź, 24.09.2021 r.
2. Damian Tarasek, Beata Gąsowska-Bajger, Hubert Wojtasek, „Wpływ związków z ugrupowaniem *p*-difenolowym na reakcję katalizowaną przez peroksydazę chrzanową”, VII Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii, Łódź, 9-10.05.2019 r.
3. Damian Tarasek, „Zastosowanie reakcji Trindera w testach diagnostycznych”, L Ogólnopolska Szkoła Chemii, Smardzewice, 30.04-04.05.2019 r.
4. Damian Tarasek, Beata Gąsowska-Bajger, Hubert Wojtasek, „Wpływ kwasu homogentyzynowego oraz dobesilanu wapnia na reakcję katalizowaną przez peroksydazę chrzanową”, XLIX Ogólnopolska Szkoła Chemii, Obrzycko, 30.11-02.12.2018 r.

Udział w ogólnopolskich konferencjach naukowych z wystąpieniem plakatowym

1. Damian Tarasek, Beata Gąsowska-Bajger, Bożena Frąckowiak-Wojtasek, Adam Drop, Hubert Wojtasek, „Wpływ aminoacetofenonów i ich tiosemikarbazonów na reakcje katalizowane przez tyrozynazę grzybową”, XLVIII Ogólnopolska Szkoła Chemii, Karczewisko, 28.04-02.05.2018 r.
2. Damian Tarasek, „Znaczenie reakcji następczych w przypadku rutynowych badań reakcji katalizowanych przez tyrozynazę”, XLIV Ogólnopolska Szkoła Chemii, Koszuty, 30.04-4.05.2016 r.

Stáže naukowe i szkolenia

1. School on molecular computational biochemistry, 11-14.03.2019 r. Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni, Polska Akademia Nauk, Kraków.
2. Staż naukowy, 31.05-11.06.2021 r. Institute of Pharmaceutical and Biomedical Sciences, Johannes Gutenberg University Mainz, Moguncja, Niemcy.
3. Jyväskylä Summer School, 9-12.08.2022 r. University of Jyväskylä, Finlandia
4. Staż naukowy, 1.10.2022-28.02.2023 r. Institute of Pharmaceutical and Biomedical Sciences, Johannes Gutenberg University Mainz, Moguncja, Niemcy.