

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Damiana Taraska
pt. „*Utlenianie wybranych leków i związków naturalnych w reakcjach katalizowanych przez peroksydazę chrzanową*”

Uwagi ogólne na temat problematyki podjętej w Rozprawie Doktorskiej

W celu ubiegania się o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki chemiczne Pan mgr Damian Tarasek przedłożył do recenzji rozprawę doktorską w formie tradycyjnej, która dotyczy przede wszystkim ustalenia wpływu wybranych związków redukujących na reakcję Trindera [reakcja kolorymetryczna pomiędzy nadtlenkiem wodoru (H_2O_2), 4-aminoantypiryną i pochodną fenolu katalizowana w obecności peroksydazy dając barwnik chinonoiminowy]. Konkretnie anality (składniki analizowanej próbki) oznaczane są przy zastosowaniu specyficznej oksydazy tworzącej jako produkt uboczny H_2O_2 . Już Dr Trinder odnotował, że ilość produktu tej reakcji może być mniejsza w obecności kwasu askorbinowego w stężeniach wyższych niż oznaczane we krwi [Genzen JR, Hunsaker JJ, Nelson LS, Faine BA, Krasowski MD. *N-acetylcysteine interference of Trinder-based assays. Clin Biochem. 2016;49 (1-2):100-4*]. Dalsze badania wykazały, że działanie peroksydazy zakłócają jest przez niektóre leki, które powodują jej fałszywie niską aktywność. Zasadne są zatem badania mające na celu ustalenie w jakich stężeniach dany lek interferuje w określonym teście diagnostycznym opartym na metodzie Trindera oraz jaki jest zakres takiej interferencji i czy jest on „istotny klinicznie”. Jest to tematyka aktualna i niezwykle ważna w czasach intensywnego rozwoju metod diagnozowania chorób. Należy zaznaczyć, że dane o interferencji leków w testach diagnostycznych opartych na reakcji Trindera z reguły podaje ich producent (np. https://www.hsa.gov.sg/docs/default-source/announcements/field-safety-notices/hsa-6004101-016-15-09_16-fsn.pdf).

Do badań wyselekcjonowano związki z ugrupowaniem p-difenolowym, spośród których interferencję w enzymatycznych testach diagnostycznych potwierdzono dla kwasu homogentyzynowego (produktu pośredniego w metabolizmie aminokwasów), kwasu gentyzynowego (dihydroksypochodna kwasu benzoowego), dobesilanu wapnia (lek stosowany w farmakoterapii schorzeń żylnych) i etamsylatu (związek chemiczny z grupy sulfonianów, lek o działaniu hemostatycznym). Kontynuowano badania stosując inne leki z ugrupowaniem p-difenolowym lub p-aminofenolowym [takie jak: ryfampicyna (*rifampicinum*), mitoksantron, czy doksorubicyna], dla których nie wykazano zafałszowań wyników enzymatycznych testów diagnostycznych. Jedynie mesalazyna (kwas 5-aminosalicylowy, niesteroidowy lek przeciwzapalny) wykazywała interferencję w reakcji Trindera. Kandydat zweryfikował również wpływ

interferencji dopaminy i dobutaminy (amina sympatykomimetyczna o działaniu inotropowym polegającym na modulowaniu siły i częstości skurczów mięśni, szczególnie serca stosowania w zastoinowej niewydolności serca) na możliwe zafałszowania wyników testów diagnostycznych wykorzystujących peroksydazę chrzanową (ang. *horseradish peroxidase*, EC 1.11.1.7, HRP). Należy nadmienić, że interferencję dopaminy i dobutaminy w takich testach diagnostycznych zauważono już w 1998 roku [Karon BS, Daly TM, Scott MG. Mechanisms of dopamine and dobutamine interference in biochemical tests that use peroxide and peroxidase to generate chromophore. *Clin Chem.* 1998;44(1):155-60]. Analiza kinetyczna oraz dokowanie molekularne dopaminy, dobutaminy oraz pochodnej dobutaminy z grupą fenolową zablokowaną przez metylację do centrum aktywnego HRP pozwoliły stwierdzić, że szybsze utlenienie grupy katecholowej w dobutaminie niż dopaminie jest konsekwencją dwóch procesów: szybszego utlenienia grupy fenolowej dobutaminy, która jest połączona z grupą aminową dłuższym łańcuchem alkilowym niż grupa katecholowa a powstający rodnik fenoksyłowy pośredniczy w utlenieniu grupy katecholowej (1), utrudnionego dostępu grupy katecholowej dopaminy do centrum katalitycznego spowodowanego zakotwiczeniem jej grupą aminową w pobliżu wejścia do centrum katalitycznego, co odzwierciedla dużo większa wartość K_m dopaminy niż dobutaminy (2). Co więcej mgr Tarasek zweryfikował także doniesienia o inhibicji HRP w teście do oznaczania kwasu moczowego przez kwas galusowy i hispidynę (pochodną kwasu kawowego), które to związki w warunkach tego testu są szybko utleniane do niestabilnych produktów. Wyniki badań Doktoranta zaowocowały publikacją ze współautorstwem badaczy z Algierii (Université Amar Telidji de Laghouat) [Tarasek D, Wojtasek H, Benarous K, Yousfi M. In vitro oxidation of hispidin and gallic acid by horseradish peroxidase. *J Biomol Struct Dyn.* 2023;41(6):2321-2325].

Wszystkie badane związki posiadają silne właściwości redukujące i mogą redukować rodnikowe produkty reakcji katalizowanych przez peroksydazy, tak jak zostało to wcześniej stwierdzone dla katecholi.

Doktorant wykazał trzy publikacje z zakresu tematyki dysertacji (str. 118 rozprawy):

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.

Publikacje te nie zostały zamieszone w dokumentacji, co więcej brakuje oświadczeń współautorów odnośnie ich udziału w powstawaniu tych prac. Wydaje się, że dysertacja Kandydata mogłaby mieć formę spójnego tematycznie zbioru opublikowanych prac, niemniej jednak wybór formy tradycyjnej jest również dopuszczalny.

Peroksydaza chrzanowa to oksydoreduktaza zdolna do utlenienia szerokiej gamy związków. Enzym ten zawiera hem z centralnym jonem Fe^{3+} jako grupę prostetyczną. W reakcji katalizowanej przez HRP, H_2O_2 jest redukowany kosztem różnych związków np. kwasu askorbinowego. Peroksydaza chrzanowa znalazła wiele zastosowań praktycznych. Jednym z nich są enzymatyczne testy diagnostyczne służące do spektrofotometrycznego oznaczania stężenia ważnych analitów, m.in. kreatyniny, kwasu moczowego, glukozy, cholesterolu czy trójglicerydów. W testach tych HRP katalizuje oksydacyjne sprzężenie 4-aminoantypiryny i fenolu lub jego pochodnych. Rezultatem reakcji Trindera jest powstanie chromoforu o maksimum absorpcji przy około 500 nm [w zależności od użytych reagentów, np. 500 nm w przypadku odczynnika Trindera zawierającego fenol; a 550 nm w przypadku mieszaniny reakcyjnej z N-etylo-N-(2-hydroksy-3-sulfopropyl)-m-toluidyną].

Hipoteza badawcza dysertacji nie jest jasno sprecyzowana. Doktorant pisze w „Celu pracy”, o inspiracji do podjęcia badań: *„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. 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.”* (str. 25 dysertacji). Rozprawa została przygotowana z zastosowaniem standardowych metod, umożliwiając uzyskanie wiążących wyników.

Merytoryczna i edytorska ocena Rozprawy Doktorskiej

Przedłożona do recenzji dysertacja na stopień doktora w dyscyplinie nauki chemiczne Pana mgr Damiana Taraska pt. *„Utlenianie wybranych leków i związków naturalnych w reakcjach katalizowanych przez peroksydazę chrzanową”* wykonana pod kierunkiem promotora - dr hab. Huberta Wojtaska, prof. Uniwersytetu Opolskiego i promotora pomocniczego dr Beaty Gąsowskiej-Bajger ma klasyczny układ. Ogółem, praca w formie typowego jednostronnego wydruku, obejmuje łącznie 119 stron wraz z wykazem dorobku naukowego. Zaproponowałabym doprecyzowanie tytułu dysertacji: „Wpływ interferencji wywoływanej przez wybrane związki redukujące na wyniki testów diagnostycznych wykorzystujących metodę Trindera”. Dobrze, kompetentnie napisana rozprawa doktorska mgr Damiana Taraska składa się ze „Wstępu”, „Celu pracy”, „Materiałów i metod”, „Wyników”, „Podsumowania”, „Spisu rysunków i tabel”, „Bibliografii” obejmującej 157 cytowań, „Streszczenia” oraz „Dodatku”. Obszerny „Wstęp” wprowadza Czytelnika w zagadnienia dotyczące charakterystyki peroksydaz, szczególnie HRP, a także wpływu interferencji wywoływanej przez wybrane związki redukujące na wyniki testów diagnostycznych wykorzystujących HRP. Podjęte badania mają przyczynić się do uwzględnienia w charakterystykach testów

diagnostycznych informacji o możliwych zafałszowaniach wyników powodowanych przez niektóre leki. Pierwszy rozdział dysertacji po części dostarcza przesłanek do sprecyzowania celu badawczego (patrz uwagi powyżej).

Użyty warsztat metodyczny przez Doktoranta jest, w moim przekonaniu, odpowiadający współczesnym standardom badań w tej dziedzinie. Mam drobną uwagę - Doktorant powinien przedstawić problemy związane ze złożonością reakcji katalitycznych, szczególnie w obecności tlenu. Warto byłoby krótko uzasadnić, dlaczego wybrano określone substancje i metody. Napotkałam drobne błędy edytorskie, np.: „1-metylo-1,3-dihydro-2H-imidazolo-2-selon, 1,2-bis(1-metylo-1H-imidazol-2-yl)diselenid i 1,3-dimetylo-1,3-dihydro-2H-imidazolo-2-selon uzyskano zostały zsyntezowane przez dr Bożenę Frąckowiak-Wojtasek”. Rozdział „Materiały i metody” obejmuje podrozdziały: „Materiały”, „Sprzęt”, „Metody ogólne”, „Reakcje z prostymi p-difenolami”, „Reakcje z mesalazyną, ryfampicyną, mitoksantronem i doksorubicyną”, „Reakcje z dopaminą, dobutaminą i jej metylowaną pochodną”, „Reakcje z kwasem galusowym, kwasem kawowym i hispidyną” i „Reakcje z metimazolem i jego analogami selenowymi”. Wszystkie metody zostały właściwie, szczegółowo opisane. Wyniki (str. 39-79) zostały przedstawione w sposób wyczerpujący i należyście udokumentowane wykresami, a także tabelami. „Podsumowanie” to zwięzła dyskusja uzyskanych wyników.

Zagłębiając się w szczegóły pracy doszukałam się kilku elementów, które mogłyby być przedmiotem dyskusji:

1. Cel pracy w mojej ocenie powinien być sformułowany ogólnie w odniesieniu do całej dysertacji a hipotezy/tezy stanowić jego uzupełnienie;
2. Autor tłumaczy różnice we wpływie kwasu homogentyzynowego, kwasu gentyzynowego, dobesilanu wapnia i etamsylatu na przebieg reakcji Trindera różnicami właściwości elektrochemicznych tych związków. Czy nie prostsze byłoby jednak wytłumaczenie ich różnicami kinetyki utleniania poszczególnych związków? Duże różnice w szybkości utleniania związku interferującego i substratu spowodują efekt wcześniejszego utleniania substancji interferującej niż właściwego substratu, tak jak na Rys. 21A (str. 39 dysertacji);
3. Jak pisze Autor na str. 41 dysertacji: „jedynie kwas homogentyzynowy jest utleniany szybko, natomiast pozostałe [związki] znacznie wolniej”. Oczywiście, różnice kinetyki mogą wynikać z różnic właściwości elektrochemicznych, ale ta zależność może być zakłócona przez czynniki steryczne wpływające na oddziaływanie z enzymem czy innymi reagentami. Stwierdzenie o szybszym utlenianiu kwasu homogentyzynowego wydaje się nieco dyskusyjne, bo wprawdzie wskazuje na nie Rys. 26 (str. 44 dysertacji), ale nie Tab. D4 (str. 106 dysertacji), zgodnie z którą np. przy stężeniu HRP równym 2 µg/ml szybkość utleniania 50 µM kwasu homogentyzynowego wynosi 17,8 µmol/min, a etamsylatu 35,1 µmol/min dla czasu reakcji 1 min;
4. Rys. 27 (str. 44 dysertacji) przedstawiający mechanizmy zakłóceń reakcji Trindera mógłby być nieco bardziej szczegółowy i uwzględniać stechiometrię reakcji. Na str. 49 dysertacji Autor pisze o utrzymywaniu „wyjściowego stężenia substratów fenolowych do momentu wyczerpania dobesilanu wapnia”. Taki efekt

nie jest widoczny na Rys. 30 i 31 (str. 47, 48 dysertacji), gdzie dobesilan zmniejszał szybkość tworzenia produktów reakcji, ale nie hamował zupełnie ich powstawania w początkowym etapie reakcji;

5. Niezasadne jest pokazywanie na Rys. 56 (str. 76) reakcji rodnika ABTS z 5 μM 1,2-bis(1-metylo-1H-imidazol-2-ylo)diselenidem i 10 μM 1-metylo-1,3-dihydro-2H-imidazolo-2-selonem. Wykresy sugerują niestechiometryczną reakcję wyższych stężeń w stosunku do niższych stężeń, a banalnym powodem takiego przebiegu wykresów jest zużycie całego ABTS• obecnego w środowisku reakcji po dodaniu wyższych stężeń reagentów. Na marginesie, dziwi mnie nazywanie rodnika ABTS• kationorodnikiem, gdyż rodnik ten powstaje w wyniku utleniania dianionu ABTS^{2-} , więc wypadkowy ładunek ABTS• to -1. Nazywanie rodnika ABTS• kationorodnikiem jest popularne w literaturze biomedycznej jednak w moim przekonaniu jest to nieporozumieniem;

6. Czy Autor sprawdzał możliwość tworzenia chromoforów absorbujących w zakresie pokrywających się z zakresem absorpcji produktów reakcji Trindera w nieobecności i w obecności 4-aminoantypiryny przez wszystkie badane interferujące difenole?;

7. Czy Doktorant rozważał dodatkową możliwość eksperymentalnego rozróżnienia pomiędzy dwoma mechanizmami interferencji – konkurencją o H_2O_2 i regeneracją substratu w reakcji z rodnikowym produktem jego utlenienia? Jedną nasuwającą się możliwością byłoby zbadanie wpływu substancji reagującej z wolnymi rodnikami substratu, tworzącej mniej reaktywne rodniki. Substancja taka nie mogłaby być jednak substratem dla peroksydazy, co wyklucza kwas askorbinowy.

Konkluzja

Recenzowana dysertacja przedstawia oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydata w dyscyplinie nauki chemiczne. W podsumowaniu stwierdzam, iż Doktorant w przedłożonej do recenzji dysertacji wykazał się umiejętnością samodzielnego prowadzenia badań naukowych i wyciągania wniosków z uzyskanych wyników. Poczynione przeze mnie uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy i nie rzutują na jej pozytywną ocenę. Spełnia ona w pełni wymogi stawiane rozprawom doktorskim, określone w artykule 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późniejszymi zmianami). Na tej podstawie wnioskuję do Wysockiej Rady Naukowej Uniwersytetu Opolskiego o przyjęcie rozprawy doktorskiej Pana mgr Damiana Taraska i dopuszczenie Doktoranta do dalszych procedur związanych z nadaniem stopnia doktora w dyscyplinie nauki chemiczne.

Rzeszów, dnia 18 sierpnia 2023

Prof. dr hab. Izabela Sadowska-Bartosz

Uniwersytet Rzeszowski
Kolegium Nauk Przyrodniczych
Kierownik Pracowni Biochemii Analitycznej
I. Sadowska-Bartosz
prof. dr hab. Izabela Sadowska-Bartosz