



Politechnika Łódzka

Międzyresortowy Instytut Techniki Radiacyjnej

Dr hab. inż., prof. uczelni, Adam Sikora

Łódź, dn. 22 sierpnia 2023 r.

Politechnika Łódzka

Wydział Chemiczny

Międzyresortowy Instytut Techniki Radiacyjnej

Żeromskiego 116

90-924 Łódź

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

Promotor: dr hab., prof. Uniwersytetu Opolskiego, Hubert Wojtasek

Promotor pomocniczy: dr Beata Gąsowska-Bajger

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została przygotowana na Wydziale Chemii Uniwersytetu Opolskiego pod kierunkiem dr. hab. Huberta Wojtaska, prof. Uniwersytetu Opolskiego, oraz dr Beaty Gąsowskiej-Bajger, w zespole, który zajmuje się m.in. badaniem reakcji enzymatycznych katalizowanych przez oksydoreduktazy. Do grupy tych enzymów należy peroksydaza chrzanowa, wykorzystywana między innymi w powszechnie stosowanych w analityce medycznej enzymatycznych testach diagnostycznych, wykorzystujących reakcję Trindera, służących do oznaczania takich analitów jak glukoza, kwas moczowy, trójglicerydy, cholesterol, czy kreatynina. W ostatnich latach pokazano, iż niektóre leki, zawierające np. N-acetylocysteinę, czy acetaminofen, ze względu na właściwości redukujące tych substancji, mogą interferować we wspomnianej reakcji Trindera, zafałszowując wyniki testów. Interferencja taka i zafałszowanie wyników testów diagnostycznych jest aktualnym i poważnym problemem współczesnej analityki. Nadrzędnym celem badawczym, jaki postawił sobie mgr Damian Tarasek było zbadanie, dla kilku grup związków o właściwościach redukujących, ich wpływu na reakcję Trindera, katalizowaną przez peroksydazę chrzanową. Badania, które podjął pan mgr Damian Tarasek, doskonale wpisują się w aktualne nurty badań chemii analitycznej i są ważne zarówno z punktu widzenia poznawczego, jak i praktycznego.

Dysertacja przygotowana została z zachowaniem klasycznego układu pracy doktorskiej - liczy 119 stron i została podzielona na 5 głównych rozdziałów: Wstęp, Cel Pracy, Materiały i metody, Wyniki, Podsumowanie, po których następują jeszcze: Spis rysunków i tabel, Bibliografia, streszczenia w językach polskim i angielskim oraz Dodatek, zawierający widma NMR oraz dodatkowe tabele i rysunki a także zestawienie dorobku naukowego autora, które obejmuje publikacje naukowe, udział w ogólnopolskich konferencjach naukowych oraz staże naukowe i szkolenia.



Wstęp jest wartościowym, choć dość syntetycznym, 25-stronicowym opracowaniem dotyczącym peroksydazy chrzanowej. We wstępie tym Autor przedstawił wpiękną ogólną charakterystykę enzymu, omówił w szczegółach strukturę peroksydazy chrzanowej C1A i oddziaływania tego enzymu z wybranymi substratami. W dalszej części tego wprowadzenia opisany jest mechanizm katalityczny peroksydazy chrzanowej oraz reakcje utleniania wybranych substratów m.in. kwasu indoliloctowego, gwajakolu, benzydiny, czy ABTS. Dalej Autor omawia praktyczne zastosowania tego enzymu, bardziej szczegółowo opisując jego wykorzystanie w enzymatycznych testach diagnostycznych, uwzględniając również zakłócenia takich testów przez różnorodne związki naturalne i środki lecznicze. Rozdział ten jest dobrym wprowadzeniem do części eksperymentalnej, pokazującym, że Doktorant potrafi krytycznie analizować dostępną literaturę przedmiotu.

Badania własne poprzedzone zostały rozdziałami zatytułowanymi „Cel pracy” (rozdział 2) oraz „Materiały i metody” (rozdział 3). W pierwszym z nich Autor na trzech stronach przedstawia ogólny cel swoich badań oraz kryteria, w oparciu o które dokonał określonego wyboru związków do ich charakterystyki w układzie enzymatycznym HRP/H₂O₂, przedstawiając przy tym jednocześnie przekonujące uzasadnienie takiego wyboru. W rozdziale „Materiały i metody” wyszczególnione zostały wykorzystane odczynniki, z określeniem ich źródła pochodzenia, opisany został sprzęt, na którym dokonywano pomiarów a także przedstawiona została metodyka eksperymentów oraz odpowiednie procedury syntez przeprowadzonych na Wydziale Chemii Uniwersytetu Opolskiego na potrzeby zaplanowanych badań. W rozdziale tym znajduje się również informacja, w jaki sposób przeprowadzono eksperymenty *in silico* dokowania dopaminy, dobutaminy i jej analogu z grupą metoksylową do HRP C1A. W mojej opinii przedstawione opisy metodyki wykonanych pomiarów są odpowiednio szczegółowe i dokładne i pozwalają odtworzyć przeprowadzone eksperymenty. Rozdział 3 liczy łącznie 11 stron.

Najobszerniejszą część rozprawy doktorskiej Pana mgr. Damiana Taraska stanowi rozdział 4 zatytułowany „Wyniki”, złożony z 5 podrozdziałów. Pierwszą część badań poświęcono określeniu wpływu wybranych *p*-difenoli, takich jak kwas homogentyzynowy, kwas gentyzynowy, dobesilan wapnia i etamsylat, na reakcję Trindera w układzie enzymatycznym HRP/H₂O₂. Autor zaobserwował istotne różnice w utlenianiu badanych *p*-difenoli przez peroksydazę chrzanową a także w ich wpływie na powstawanie chromoforu z 4-aminoantypiryny i fenolu. Kwas homogentyzynowy był szybko utleniany przez enzym, całkowicie blokując powstawanie chromoforu, podczas gdy inne *p*-difenole jedynie spowalniały proces tworzenia wspomnianego barwnika. Wpływ badanych związków zależny był od ich struktury i odpowiednich standardowych potencjałów par redoks chinon/*p*-difenol. W interpretacji wyników przedstawionej przez Doktoranta badane *p*-difenole z podstawnikami wyciągającymi elektrony z pierścienia aromatycznego wpływały na powstawanie chromoforu przede wszystkim wedle drugiego z wymienionych mechanizmów (poprzez redukcję rodnika fenoksyloвого powstającego z utlenianego fenolu lub kationorodnika 4-aminoantypiryny, będącego produktem jenoelektronowego utleniania 4-aminoantypiryny). Wyniki przedstawione w tym podrozdziale stały się podstawą publikacji naukowej *Mechanisms of interference of p-diphenols with the Trinder reaction* opublikowanej w roku 2020 w czasopiśmie *Bioorganic Chemistry* (o wartości współczynnika wpływu IF₂₀₂₀ = 5,275). W dobesilanie wapnia i etamsylacie występuje ten sam anion kwasu 2,5-dihydroksybenzenosulfonowego, przy



czym w roztworze o określonym stężeniu molowym dobesilanu wapnia stężenie tego anionu jest dwukrotnie wyższe, niż w odpowiednim roztworze etamsylatu. Istotne podobieństwa przebiegów kinetycznych obrazujących zmiany absorbancji przedstawione na panelach C i D rysunków 21, 23 i 26 sugerują, iż podane stężenia odnoszą się do stężenia anionu a nie do stężenia soli. Warto by Doktorant uściślił to podczas publicznej obrony swojej pracy doktorskiej. W opinii recenzenta w dyskusji wyników przedstawionych na rysunkach od 21 do 26 zabrakło wyraźnego podkreślenia tego, iż dla obu soli mamy do czynienia z tym samym anionem (tym samym *p*-difenolem).

W kolejnej części pracy (podrozdział 4.2) Autor przeprowadził podobne badania dla substancji leczniczych zawierających w swej strukturze ugrupowania *p*-difenolowe (lub analogiczne ugrupowanie *p*-aminofenolowe w przypadku mesalazyny). Badania przeprowadzono dla mesalazyny, ryfampicyny, mitoksantronu i doksorubicyny. Wartościową częścią tego podrozdziału jest dyskusja potencjalnego wpływu na testy diagnostyczne oparte na reakcji Trindera badanych substancji w stężeniach, jakie osiągają one w osoczu pacjentów.

W podrozdziale 4.3 Autor badał utlenianie dopaminy, dobutaminy i jej analogu z grupą metoksyłową. Wyniki przeprowadzonych badań pokazały, iż szybkość utleniania dobutaminy przez peroksydazę chrzanową jest znacząco wyższa niż szybkość utleniania dopaminy w takim samym układzie. Dla analogu dobutaminy z grupą metoksyłową obserwowano pośrednie szybkości utleniania. Interesującej i przekonującej interpretacji wyników eksperymentów Autor dokonał w oparciu o dokowanie molekularne badanych związków do struktury HRP C1A. Analiza dokowania molekularnego sugeruje, iż czynnikiem decydującym o obserwowanych różnicach w szybkości utleniania badanych związków jest odległość między grupą podatną na utlenianie a żelazem hemowym. Wyniki przedstawione w podrozdziale 4.3 stały się podstawą publikacji naukowej *Oxidation of dobutamine and dopamine by horseradish peroxidase* opublikowanej w roku 2022 w czasopiśmie *Journal of Molecular Structure* (wartość współczynnika wpływu $IF_{2021} = 3,8$).

Kolejna część rozdziału 4 poświęcona jest określeniu wpływu kwasu galusowego, hispidyny oraz kwasu kawowego na powstawanie chromoforu w reakcji Trindera w układzie enzymatycznym HRP/H₂O₂/4-aminoantypiryna/ kwas 3,5-dichloro-2-hydroksybenzenosulfonowy (DHBS). Zarówno kwas galusowy, jak i hispidyna zostały wcześniej opisane jako inhibitory peroksydazy chrzanowej. Badania przeprowadzone przez Doktoranta pokazały jednak, że oba związki są szybko utleniane przez badany enzym. Przeprowadzone badania pokazały ponadto, że produkty utleniania kwasu kawowego i hispidyny reagują w badanym układzie enzymatycznym z 4-aminoantypiryną, dając niestabilne produkty sprzężenia. Wyniki te stały się podstawą trzeciej publikacji naukowej Doktoranta, przygotowanej na podstawie badań opisanych w recenzowanej rozprawie doktorskiej. Publikacja pt. *In vitro oxidation of hispidin and gallic acid by horseradish peroxidase* opublikowana została w tym roku w czasopiśmie *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* (wartość współczynnika wpływu $IF_{2022} = 4.4$).

Ostatni podrozdział rozdziału 4, omawiającego wyniki, dotyczył badań inhibitora peroksydazy tarczycowej, metimazolu, oraz jego selenowych analogów. Poszukiwania inhibitorów peroksydazy tarczycowej prowadzone są zazwyczaj z wykorzystaniem laktoperoksydazy i ABTS, jako substratu dającego

stosunkowo stabilny produkt jednoelektronowego utleniania – kationorodnik ABTS. Biorąc pod uwagę dość wysoką wartość standardowego potencjału pary $ABTS^{\bullet+}/ABTS$ ($E^\circ = 0,68$ V) w badaniach takich należy zawsze brać pod uwagę chemiczną redukcję tego kationorodnika przez testowane związki. Doktorant pokazał, iż zarówno metimazol, jak i jego selenowe analogi zdolne są do stosunkowo szybkiej redukcji kationorodnika ABTS. Jako osoba zajmująca się kinetyką chemiczną nadmienię, iż cennym uzupełnieniem tych badań byłaby próba wyznaczenia wartości odpowiednich stałych szybkości badanej reakcji. Autor w podrozdziale tym pisze: „Przeprowadziliśmy więc reakcje 6-*n*-propylo-2-tiouracylu, metimazolu i selenowych analogów metimazolu z kationorodnikiem ABTS wygenerowanym chemicznie przez utlenianie ABTS nadsiarczanem potasu.” Dalej zaś: „Wszystkie związki szybko reagowały z $ABTS^{\bullet+}$ (...)” W podrozdziale tym nie udało mi się jednak odnaleźć wykresu obrazującego redukcję $ABTS^{\bullet+}$ przez 6-*n*-propylo-2-tiouracyl. W opisie eksperymentów Autor skupił się na zaprezentowaniu wyników uzyskanych dla metimazolu i jego selenowych analogów. Dla ustalenia mechanizmu oksydatywnej transformacji selenowego analogu metimazolu bardzo przydatne były wyniki analiz NMR.

W podsumowaniu części badań własnych pragnę podkreślić, że zostały one zaplanowane logicznie, a następczość podejmowanych zadań świadczy o metodycznym podejściu do badanego zagadnienia. Mgr Damian Tarasek w swoich badaniach wykorzystał różnorakie techniki badawcze dobrze dobierając je do problemów, jakie chciał rozwiązać, co dowodzi dojrzałości naukowej Doktoranta.

Potwierdzeniem naukowej wartości wyników badań własnych zrealizowanych przez Doktoranta jest opublikowanie na ich podstawie wymienionych już wyżej trzech wieloautorskich publikacji oryginalnych w czasopismach o międzynarodowym obiegu i wysokiej renomie na rynku wydawniczym, w których Doktorant jest pierwszym autorem. Poza wspomnianymi pracami Doktorant jest również pierwszym autorem pracy *Rifampicin is not an inhibitor of tyrosinase* opublikowanej w roku 2022 w czasopiśmie *International Journal of Biological Macromolecules* (wartość współczynnika wpływu $IF_{2022} = 8.2$).

Oceniana praca doktorska została napisana w sposób czytelny i klarownie pokazuje osiągnięte wyniki obszernego programu badawczego. Cały tekst napisany jest poprawnym językiem i czyta się go płynnie. W trakcie lektury nasunęły mi się nieliczne uwagi o charakterze merytorycznym i redakcyjno-edytorskim. Nie obniżają one wartości warstwy merytorycznej pracy. Wymieniam je poniżej z obowiązku i przywileju recenzenta:

str. 4, wiersz 1: sformułowanie „*dzięki czemu powstające rodniki znajdują się blisko powierzchni komórki, mogą ją zdestabilizować*” jest dość niezgrabne, choć wiadomo, iż chodzi o to, że rodniki generowane są w sąsiedztwie błony komórkowej, co może prowadzić do jej oksydacyjnych uszkodzeń;

str. 6, wiersz 12 i str. 7 wiersz 3: powinno być „*zawiera*” zamiast „*zamiera*”;

str. 8: „*Dużo bardziej typowym*” wystarczy „*Typowym*”;

str. 14, Rysunek 13: umieszczenie kropki i znaku plus przy jednym z atomów azotu struktury kationorodnika ABTS, może sugerować, iż w cząsteczce tej możemy wskazać jeden atom, gdzie zlokalizowane jest centrum rodnikowe, podczas gdy stabilność tego kationorodnika wynika ze znacznej delokalizacji gęstości spinowej w obrębie całej struktury; podobnie na rysunku 12, w przypadku benzydyny. W takich przypadkach najlepiej jest wziąć strukturę w nawias kwadratowy, umieszczając kropkę i plus z prawej strony nawiasu, u góry;

str. 15: sformułowanie *elektroda wymaga więcej energii niż jest potrzebne do przeprowadzenia reakcji* jest w mojej ocenie dość niezgrabne;

str. 13 i str. 16: szkoda, iż opis utleniania kwasu indoliloctowego przez peroksydazę chrzanową rozbity jest na dwa niepołączone ze sobą fragmenty;

str. 21: słowo *intermediat* jest brzydkim i niepotrzebnym anglicyzmem, w języku polskim używamy określenia *produkt pośredni*;

str. 25 i dalej: produktem jednoelektronowego utleniania 4-aminoantypiryny jest zapewne kationorodnik 4-aminoantypiryny a nie rodnik *antypirylowy*, jak go określa Autor. Nazwy kationorodników można tworzyć, dodając końcówkę *-iumyl* (gdzie *-ium* wskazuje na ładunek dodatni a *-yl* na rodnikową naturę indywiduum chemicznego, lecz ta zasada IUPAC, choć zalecana, nie jest powszechnie stosowana, patrz *Skorygowana nomenklatura rodników, jonów, jonorodników i podobnych indywiduów chemicznych*. M. Hoffmann, S. Milewski, W. Przychodzień, T. Sokołowska, D. Witt, Wiad. Chem. Biblioteka, 2001. ISBN 83-229-1082-7);

str. 41: „*Wykazano, że jedno- i dwuelektronowy potencjał redukcyjny p-difenoli (...)*” – termin *potencjał redukcji* nie jest obecnie zalecany (a już z pewnością nie należy używać terminu *potencjał redukcyjny*). Poprawnym terminem jest *potencjał elektrody* lub *potencjał pary redoks* (w pierwszym i w drugim przypadku dobrze jest określić parę redoks, do której odnosi się przytaczana wartość potencjału); jeśli mowa o *standardowych potencjałach* lub *standardowych biologicznych potencjałach* (tj. *standardowych potencjałach* odnoszących się do roztworów wodnych o pH 7), należy to zaznaczyć. Warto podkreślić ponadto, iż w przytaczanej pracy 126 dyskutowane są dwuelektronowe standardowe potencjały par redoks chinon/*p*-difenol oraz jednoelektronowe standardowe potencjały par redoks chinon/rodnik semichinonowy, podczas gdy dla dyskusji wyników omawianych w rozprawie doktorskiej najlepiej byłoby sięgnąć po wartości jednoelektronowych standardowych potencjałów par redoks rodnik semichinonowy/*p*-difenol.

Wymienione powyżej nieścisłości i usterki redakcyjno-edytorskie nie wpływają w najmniejszym stopniu na moją pozytywną ocenę rozprawy opisującej kompetentnie interesujący program badawczy. Stwierdzam, że przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska pana mgr. Damiana Taraska pt. „Utlenianie wybranych leków i związków naturalnych w reakcjach katalizowanych przez peroksydazę chrzanową” stanowi oryginalne rozwiązanie postawionego problemu naukowego, wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w dyscyplinie nauki chemiczne oraz wskazuje na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej i w pełni spełnia ustawowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 ust. 1-2 ustawy *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce*. Wnoszę zatem do Rady Naukowej Uniwersytetu Opolskiego o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Adam Siler