



POLITECHNIKA POZNAŃSKA

dr hab. inż. Jakub Zdarta, prof. PP
Wydział Technologii Chemicznej
Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej
ul. Berdychowo 4, 60-965 Poznań
tel. +48 61 665 3720, fax +48 61 665 3649
e-mail: Jakub.Zdarta@put.poznan.pl



Poznań, 07.08.2023r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pana mgra Damiana Taraska

pt.: „Utlenianie wybranych leków i związków naturalnych w reakcjach katalizowanych przez peroksydazę chrzanową”

przygotowana zgodnie z pismem Przewodniczącego Rady Naukowej Uniwersytetu Opolskiego z dnia 22.06.2023r.

Rozprawa doktorska mgra Damiana Taraska została zrealizowana w Instytucie Chemii Uniwersytetu Opolskiego pod kierunkiem dra hab. Huberta Wojtaska, prof. UO oraz przy współdziałaniu dr Beaty Gąsowskiej-Bajger w roli promotora pomocniczego. Zakres przedłożonej pracy w ogólnym zarysie dotyczy scharakteryzowania wpływu obecności wybranych związków redukujących na reakcje enzymatyczne katalizowane przez peroksydazę chrzanową (HRP), które stanowią bazę wielu testów diagnostycznych i opierają się o reakcję Trindera.

Tematyka badań podjęta w rozprawie doktorskiej jest aktualna i istotna nie tylko z naukowego, ale także z praktycznego punktu widzenia, bowiem testy diagnostyczne oparte o reakcje Trindera stanowią bazę szybkich testów analitycznych stosowanych w praktyce medycznej i laboratoryjnej do detekcji różnych związków. Co więcej, powszechne zainteresowanie wzbudza też HRP i jej właściwości, czego potwierdzeniem jest opublikowanie znacznej ilości doniesień literaturowych związanych z hasłem „horseradish peroxidase”. Od 2000 roku opublikowano ponad 16 000 prac związanych z właściwościami, charakterystyką oraz reakcjami katalizowanymi przez ten enzym. Dane te jednoznacznie potwierdzają aktualność podjętej tematyki badawczej.

Kataliza enzymatyczna, zwana także biokatalizą, obejmuje procesy, w których jako katalizatory wykorzystuje się enzymy, zdolne do znacznego przyspieszenia prowadzonych przemian poprzez obniżenie energii aktywacji. Spośród wielu grup enzymów, biokatalizatory z grupy oksydoreduktaz (EC1) są najszerzej wykorzystywane w niezwykle szerokim zakresie różnorodnych aplikacji. Spośród nich jedną

z najbardziej interesujących grup stanowią peroksydazy, w tym takie enzymy jak peroksydaza manganowa, peroksydaza ligninowa czy peroksydaza chrzanowa. Są to enzymy które jako jeden z substratów wykorzystują wodę utlenioną, która ulega redukcji do wody, przy jednoczesnym utlenieniu związków organicznych do wolnych rodników. Ze względu na szeroką dostępność HRP, jest to enzym najczęściej stosowany w praktyce przemysłowej, ale także w aplikacjach naukowych czy medycznych. Zwłaszcza ostatnie zastosowanie potęguję istotność prowadzenia prac nad HRP, bowiem enzym ten jest podstawowym czynnikiem reporterowym wielu testów diagnostycznych bazujących na zmianie zabarwienia. Zmiana ta jest następnie analizowana i na jej podstawie określa się stężenie bądź potwierdza obecność danej substancji. Ze względu na fakt, że HRP katalizuje konwersje relatywnie szerokiej grupy substratów, spora ilość związków organicznych może przez ten enzym być utleniana. Co gorsza, często są to związki które obecne są także w mieszaninach poddawanych testom opartym na HRP. Istnieje też grupa substancji, które osłabiają katalityczne działanie tego enzymu. Czynniki te negatywnie wpływają na uzyskiwane rezultaty testów prowadząc do ich niewiarygodności, co w praktyce ogranicza ich stosowanie. Istnieje zatem szereg czynników, które mogą wpływać na efektywność testów diagnostycznych opartych na enzymach, a analiza tych zmiennych to wyzwanie, które musi być poważnie rozważone przy projektowaniu tych reakcji.

W ten nurt badawczy doskonale wpisuje się tematyka rozprawy doktorskiej Pana mgra Damiana Taraska, co wskazują na jej istotność i aktualność, a także na potencjał praktyczny uzyskanych wyników. Celem badań realizowanych w ramach pracy było przeanalizowanie wpływu różnych związków fenolowych o właściwościach redukujących na katalizowaną enzymatycznie reakcję Trindera. W pracy wykorzystano peroksydazę chrzanową, jako podstawowy enzym oraz analizowano wpływ związków z ugrupowaniem *p*-difenolowym o różnej wielkości struktury czy substancji z ugrupowaniem *p*-aminofenolowym i innych leków, a także dopaminy oraz dobutaminy na zakłócenia wyników testów Trindera. Analizowane mieszaniny reakcyjne zawierające różne stężenia badanych związków zostały następnie przeanalizowane z wykorzystaniem głównie pomiarów spektrofotometrycznych, które umożliwiły ocenę składu mieszanin w trakcie reakcji. W pracy niezwykle istotna była też analiza mechanizmów prowadzonych przemian oraz określenie sposobu wiązania substratów w centrum aktywnym enzymu.

Rozprawa doktorska Pana mgra Damiana Taraska liczy 119 stron, jest napisana w języku polskim i została zilustrowana 58 rysunkami oraz 2 tabelami w części głównej (praca zawiera też Dodatek na który składają się tabele oraz rysunku z wynikami badań). Przedkładana dysertacja przygotowana jest w klasycznym układzie i podzielona jest na 10 części, z czego najważniejsze rozdziały to: Wstęp (22 strony), Cel pracy (3 strony), Materiały i metody (11 stron), Wyniki (32 stron) oraz Podsumowanie (3 strony). W pracy zamieszczono też cytowaną bibliografię na którą składa się 157 pozycji. Cytowana

literatura jest zróżnicowana, dobrana w odpowiedni sposób, a zaprezentowane przykłady właściwie ilustrują poruszane w pracy zagadnienia. Całość pracy zwieńczona jest dorobkiem naukowym Doktoranta. Brakuje w pracy informacji, które bardziej przybliżyłyby sylwetkę naukową Doktoranta.

Zaprezentowany wstęp teoretyczny obejmuje 22 strony i został podzielony na 3 główne rozdziały, w których Autor w syntetyczny sposób przedstawia zagadnienia związane z tematyką rozprawy. Scharakteryzowano peroksydazy, a także przybliżono wybrane, acz szczegółowe, informacje nt. peroksydazy chrzanowej, jej struktury, mechanizmu działania oraz praktycznego zastosowania tego enzymu. W dalszych częściach wstępu Doktorant przybliżył zagadnienia dotyczące czynników jakie mogą wpływać na zakłócenia enzymatycznych testów diagnostycznych na bazie HRP. Część literaturowa jest interesująca, a opisane tematy są trafnie dobrane pod kątem tematyki całej rozprawy. W tej części pracy pewien niedosyt budzi bardzo skrótowe potraktowanie potencjalnego wykorzystania HRP w procesach usuwania zanieczyszczeń środowiskowych, a także brak choćby krótkiego podsumowania zawartych informacji, które stanowiłyby swoiste główne przesłanie wstępu.

Kolejną część pracy stanowi rozdział Materiały i metody, w którym Autor dość obszernie przedstawił opis stosowanej metodyki badawczej oraz wykorzystanych technik analitycznych. W sposób wyczerpujący, umożliwiając precyzyjne powtórzenie eksperymentów opisano zwłaszcza przeprowadzone reakcje chemiczne. Przybliżono też opis w jaki sposób wyznaczano poszczególne parametry i stałe oraz przybliżono sposób przeprowadzenia modelowania komputerowego. Jediną wątpliwość w tej części pracy budzi dość skromny zakres stosowanych technik analitycznych, które w pełniejszy sposób zobrazowałyby prowadzone reakcje.

W najbardziej rozbudowanej części pracy – Wyniki – mgr Damian Tarasek prezentuje w czytelny sposób, jak i omawia oraz analizuje wyniki badań laboratoryjnych. Część ta przygotowana jest w sposób przejrzysty i zorganizowany, stanowi logiczną całość i składa się z 5 głównych zagadnień:

1. Reakcje z prostymi *p*-difenolami.
2. Reakcje z *p*-difenolami o rozbudowanych strukturach.
3. Utlenianie dopaminy, dobutaminy i jej analogu.
4. Reakcje w kwasem galusowym, kwasem kawowym i hispidyną.
5. Reakcje z metimazolem i jego analogami selenowymi.

W pierwszym etapie badań Doktorant przeanalizował wpływ 4 prostych *p*-difenoli, a więc kwasu homogentyzynowego, kwasu gentyzynowego, dobesilanu wapnia oraz etamsylatu na formowanie się chromoforu w reakcji Trindera. Jednak poza zastosowaniem fenolu, jako klasycznego odczynnika w reakcji Trindera, oceniono także wpływ powyższych substancji na reakcje Trindera w których alternatywnie do fenolu zastosowano kwas 3-hydroksy-2,4,6-trijodobenzoowy lub kwas 3,5-dichloro-2-hydroksybenzenosulfonowy. Doktorant trafnie i wnikliwie analizuje wpływ poszczególnych związków,

zarówno substancji zakłócającej, jak i substratu fenolowego, na rodzaj zakłóceń generowanych w reakcji Trindera. W mojej opinii szczególnie cenna w tej części pracy jest próba zaproponowania mechanizmu zakłóceń reakcji Trindera jakie powodują analizowane *p*-difenole.

W kolejnym etapie badań przeprowadzono analogiczne prace, przy czym jako substancje zakłócające przetestowano związki zawierające ugrupowania *p*-difenolowe oraz *p*-aminofenolowe, którymi były mesalazyna, ryfampicyna, mitoksantron oraz deoksorubicyna. Są to substancje stosowane jako leki w różnych schorzeniach, stąd ich obecność oraz rozbudowana struktura chemiczna mogą generować inny mechanizm zakłóceń. Doktorant wykazał iż w obecność wspomnianych substancji w mieszaninie skutkuje dużo bardziej złożonym przebiegiem procesu i obecnością w mieszaninie reakcyjnej zarówno chromoforu reakcji Trindera, produktu utleniania danego związku, a nawet obecnością wolnych rodników. Na str. 57 rozprawy Doktorant napisał, że „należałoby wykonać jeszcze dodatkowe eksperymenty” aby określić bardziej szczegółowo wpływ tych związków na przebieg reakcji. Stąd moja prośba o doszczegółowienie jakie eksperymenty i techniki badawcze Doktorant miał na myśli.

W następnym etapie badań przeprowadzono studia nad szybkością utleniania dopaminy, dobutaminy i jej metylowanego analogu przez peroksydazę chrzanową. Prace rozpoczęto od wykonania procesów katalitycznego utleniania powyższych związków, a dla reakcji tych określono parametry kinetyczne. Ze względu na znaczne różnice w przebiegu obu procesów przeprowadzono zaawansowane studia z wykorzystaniem dokowania molekularnego, które obrazują sposób wiązania badanych substancji w centrum aktywnym enzymu. Na podstawie uzyskanych modeli możliwości przyłączenia dopaminy i jej pochodnych oraz wykorzystując wartości parametrów kinetycznych, Doktorant wykazał, że związki nie posiadające w swojej strukturze grup zdolnych do tworzenia wiązań wodorowych mają łatwiejszy dostęp do centrum aktywnego enzymu i są utleniane szybciej, jednak na ogólny przebieg procesu wpływ ma więcej zmiennych.

Kolejny etap stanowi kontynuację nurtu prac zrealizowanych w pierwszych częściach pracy, a tym razem przeanalizowano wpływ kwasu galusowego, kwasu kawowego oraz hispidyny na reakcję Trindera, ze względu nie do końca poznaną rolę tych związków (substraty enzymu, inhibitory enzymu, przeciwutleniacze) w mechanizmie działania HRP. Wnikliwie przeanalizowano w jaki sposób rosnące stężenie badanych związków oraz czas reakcji wpływa na zmiany absorbancji. Przeprowadzono także próby w których analizowano zmiany stężenia nadtlenu wodoru w próbce, jak i wykonano dodatkowe eksperymenty z nadjodanem sodu. Wszystkie te prace miały na celu jak najdokładniejsze określenie roli i wpływu poszczególnych związków na tworzenie chromoforów i przebieg reakcji Trindera. Konkluzją dla tego etapu jest fakt, że mechanizm tych reakcji jest skomplikowany i wciąż niejednoznaczny. Prosiłbym w tym miejscu także o bardziej precyzyjne wyjaśnienie idei zmiany ilości enzymu użytego w testach

realizowanych w tym etapie badań. Do zmiennych ilości enzymu stosowanych w reakcjach odnoszę się też w komentarzach ogólnych

W finalnym etapie badań podjęto się próby określenia wpływu metimazolu oraz jego selenowych pochodnych na przebieg reakcji z kationorodnikiem ABTS, jako modelowym substratem, a także na przebieg reakcji Trindera. Metimazol i jego pochodne przykuwają uwagę ze względu na ich zastosowanie w leczeniu nadczynności tarczycy, a dodatkowo zweryfikowano hipotezę, że związki te łatwo reagują z kationorodnikiem ABTS. W pracach skupiono się na analizie mechanizmu tej reakcji, a w tym celu wykorzystano przede wszystkim widma jądrowego rezonansu magnetycznego. Szczegółowa analiza widm NMR otrzymanych w trakcie trwania procesu pozwoliła na identyfikację powstających produktów pośrednich i zaproponowanie reakcji przebiegających w układzie. Finalnie wykazano jednak, że żadna z selenowych pochodnych metimazolu nie ma większego wpływu na przebieg reakcji Trindera.

W kontekście omówionych wyżej osiągnięć chciałbym podkreślić, że recenzowana praca traktuje nie tylko o wpływie poszczególnych związków na reakcję Trindera, ale także stanowi pogłębione studium nad możliwymi mechanizmami reakcji, powstającymi produktami pośrednimi oraz sposobem wiązania substratu w centrum aktywnym enzymu. Przedstawiony materiał, zarówno teoretyczny, jak i doświadczalny jest bogaty. Postawione cele badawcze zostały zrealizowane, a uzyskane zależności stanowią element nowości naukowej. Zrealizowane prace odznaczają się ponadto znaczną oryginalnością, a do najważniejszych osiągnięć rozprawy zaliczam:

1. Zdefiniowanie i wyjaśnienie mechanizmów zakłóceń reakcji Trindera powodowanych przez różne grupy związków fenolowych.
2. Szczegółowe opisanie mechanizmu zakłóceń testów diagnostycznych wywoływanych przez dopaminę oraz dobutaminę wsparte symulacjami wiązania tych związków w centrum aktywnym HRP.
3. Zweryfikowanie potencjalnego wpływu inhibującego kwasu galusowego oraz hispidyny, a także metimazolu oraz jego selenowych pochodnych na aktywność peroksydazy chrzanowej.

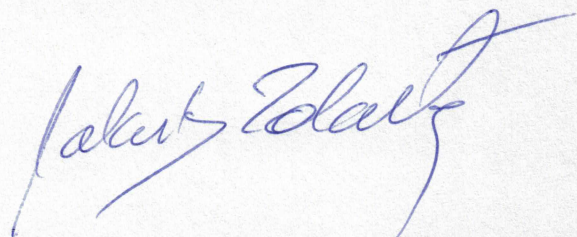
Obowiązkiem recenzenta jest także wskazanie pewnych niedokładności, nieścisłości, bądź nieprecyzyjnych sformułowań oraz ocena merytoryczna, która ma wskazać pewne niejasności czy sugestie. Chciałbym podkreślić, że praca jest napisana starannie, poprawnie językowo i stylistycznie, wyróżnia się ponadto estetyczną szatą graficzną. Choć Autor nie ustrzegł się kilku błędów językowych, edytorskich czy stylistycznych trudno mówić, by utrudniały one odbiór pracy. Mam jednak kilka uwag i pytań, które nasunęły mi się w trakcie lektury pracy, i które stawiam w celu doprecyzowania pewnych zagadnień:

1. W prowadzonych reakcjach katalitycznych stosowano różne stężenia wybranych substratów, zmienne ilości H_2O_2 , a także zmienne stężenia/aktywności HRP. Czym było to spowodowane i jaki był cel tych

- działań? Aby łatwiej porównywać wyniki i przeprowadzić ich analizę, najkorzystniej jest prowadzić reakcje używając takich samych warunków początkowych dla wszystkich procesów.
2. W części eksperymentalnej, przy opisie sekcji 3.6.4., powinno znaleźć się dodatkowo równanie Hanesa-Wolfa stosowane w obliczeniach. Dodatkowo prosiłbym Doktoranta o wyjaśnienie dlaczego zdecydowano się na wykorzystanie tego modelu do obliczeń kinetycznych i jakie są jego zalety w porównaniu z innymi modelami?
 3. Zdecydowanie szerszego komentarza wymaga fakt, dlaczego dodatek kwasu homogenyzyznowego całkowicie hamuje wzrost absorbancji w reakcji Trindera (Rys. 21 i 22)?
 4. Prosiłbym Doktoranta o bardziej szczegółową dyskusję i wyjaśnienia związane z Rys. 27. Z zaprezentowanego w pracy opisu nie wynikają bowiem różnice widoczne na rysunku, stąd prośba o głębszy komentarz tego zagadnienia.
 5. Doktorant w części Materiały i metody wskazał, że każdy pomiar/reakcję wykonywano trzykrotnie. Jakie było znaczenie tego zabiegu jeśli na każdym rysunku i w każdej tabeli podano tylko jedną wartość. Czy jest to wartość średnia z 3 pomiarów, czy jest to losowo wybrana wartość? Dodatkowo na wykresach oraz w tabelach brak jest wartości słupków błędów obrazujących błędy wyników i ich rozrzut. Proszę o szczegółowe wyjaśnienia w tym zakresie.
 6. W przedłożonej pracy podstawową technikę analityczną wykorzystywaną w pomiarach stanowiła spektroskopia UV-Vis, która w niektórych analizach była wspierana np. spektroskopią jądrowego rezonansu magnetycznego. Zdaję sobie sprawę, że spektroskopia UV-Vis to najlepsze narzędzie do analizy omawianych reakcji, jednak prośba do Doktoranta o wskazanie jakie inne techniki badawcze i analityczne można zastosować, i dlaczego, żeby lepiej zinterpretować uzyskane wyniki?
 7. Autor w pracy często powołuje się na „szybkość utleniania” lub „szybkość reakcji”. Brak jednak w pracy danych, które w bezpośredni sposób charakteryzują te parametry. W takim przypadku dobrze jest oprzeć dyskusję wyników na danych, które w sposób bezpośredni zaprezentują opisywaną wartość. Stąd pytanie, dlaczego dla analizowanych procesów nie wyznaczono stałych ich szybkości reakcji?

Recenzowana rozprawa reprezentuje dobry poziom naukowy, zawiera elementy nowości naukowej, a wymienione uwagi polemiczne i pytania nie wpływają znacząco na pozytywny odbiór pracy. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorant uzyskał szereg interesujących rezultatów, które zostały już częściowo opublikowane. Na całkowity dorobek naukowy Doktoranta składają się 4 publikacje naukowe, z czego 3 bezpośrednio związane z tematyką prowadzonych prac, a także wystąpienia ustne (4) oraz prezentacje posterów (3) na ogólnopolskich konferencjach naukowych. Wartym podkreślenia jest odbycie przez Doktoranta 4 stażów naukowych, z czego 3 w placówkach zagranicznych, co niewątpliwie miało znaczny wpływ na rozwój Doktoranta i podniesienie poziomu jego badań.

Na podstawie oceny rozprawy doktorskiej autorstwa Pana mgra Damiana Taraska zatytułowanej „Utlenianie wybranych leków i związków naturalnych w reakcjach katalizowanych przez peroksydazę chrzanową” oraz zawartej w dysertacji aktywności naukowej jednoznacznie stwierdzam, że recenzowana rozprawa spełnia wymogi ustawowe i zwyczajowe stawiane rozprawom doktorskim. Wniosuję zatem do Rady Naukowej Uniwersytetu Opolskiego o przyjęcie pracy i przeprowadzenie dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Jolanta Zdziały', is written in a cursive style.