

Streszczenie rozprawy doktorskiej pod tytułem:

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

Promotor: dr hab. Hubert Wojtasek, prof. UO

Promotor pomocniczy: dr Beata Gąsowska-Bajger

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 dobesilanu wapnia na warianty reakcji Trindera zawierające 3,5-dichloro-2-hydroksybenzenosulfonian sodu lub kwas 3-hydroksy-2,4,6-trijodobenzoowy, 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 obydwa 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 fenoksyłowy 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 większa 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.