



Opole, 26.09.2019

Dr hab. Małgorzata Pawełczak, prof. UO  
Zakład Chemii Fizycznej i Modelowania Molekularnego  
Wydział Chemii  
Uniwersytet Opolski w Opolu

## RECENZJA

ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR INŻ. EWY WOLIŃSKIEJ  
pt. „MAŁOCZĄSTECZKOWE INHIBITORY TYROZYNAZY – PROJEKTOWANIE  
ORAZ BADANIE ODDZIAŁYWAŃ Z ENZYMEM”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej pod kierunkiem dr hab. Rafała Latajki, prof. PWr. Tematyka badawcza pracy dotyczy poszukiwania inhibitorów tyrozynazy. Tyrozynaza jest metaloenzymem pełniącym ważną rolę w procesie melanogenezy. Inhibitory tego enzymu mogą mieć znaczenie aplikacyjne.

### INFORMACJE OGÓLNE

Dysertacja doktorska mgr inż. Ewy Wolińskiej liczy łącznie 167 stron tekstu, w tym 44 rysunki oraz 11 tabel. Pod względem edytorskim przygotowana została poprawnie. Układ pracy jest typowy dla prac eksperymentalnych. Po stronie tytułowej, dwóch stronach podziękowań i spisie treści, znajduje się wykaz skrótów stosowanych w pracy. Numeracja w pracy rozpoczyna się od spisu treści, który obejmuje 5 zasadniczych rozdziałów: WSTĘP, CEL PRACY, MATERIAŁY I METODY, WYNIKI I DYSKUSJA, PODSUMOWANIE, na końcu znajduje się wykaz LITERATURY i DOROBK NAUKOWY (Doktorantki). Rozdziały: WSTĘP, MATERIAŁY I METODY oraz WYNIKI i DYSKUSJA mają rozbudowaną strukturę podrozdziałów. Praca napisana jest zrozumiałym językiem. Tabele i rysunki zostały przygotowane poprawnie, brak natomiast na końcu pracy ich spisu, może wtedy Autorka zauważyłaby, że numer rysunku 27 pojawia się dwukrotnie pod rysunkami na stronach 95 i 99.

Przytoczona literatura została prawidłowo dobrana do tematyki rozprawy i obejmuje 156 pozycji. W większości cytowane są prace z lat 2008-2019, co świadczy o aktualności



podjętej przez Doktorantkę tematyki. W tej części pracy Doktorantka nie ustrzegła się drobnych błędów edytorskich: np. brak nazwiska autora w pozycji 141 spisu literatury.

Doktorantka nie uniknęła również drobnych błędów językowych, przejęzyczeń, dość dużej ilości powtórzeń i niezręcznych sformułowań (np. na str. 97 zdanie „Wystąpienie tego rodzaju hamowania oznacza, że inhibitor może oddziaływać zarówno z wolną formą enzymu, jak i z utworzonym już wcześniej **kompleksem enzym-inhibitor**”, a powinno być **kompleksem enzym-substrat** lub na str. 86 „Aby **poprawnie** obliczyć ilość otrzymanego białka, przygotowano wcześniej krzywą wzorcową dla albuminy wołowej (BSA)”. Stosując metodę Bradford ilość białka można wyznaczyć tylko na podstawie krzywej wzorcowej, więc słowo **poprawnie** nie jest tu konieczne). Z uwagi na to, że błędy te nie mają wpływu na wartość merytoryczną pracy, nie będę ich wszystkich wyliczała.

Elementem końcowym pracy jest podsumowanie działalności naukowej Doktorantki. Składają się na nią: 3 publikacje naukowe, w tym dwie z listy A o sumarycznym współczynniku wpływu (IF) około 5,4 oraz jedna publikacja wysłana do redakcji czasopisma z listy A, 10 komunikatów na konferencjach krajowych i zagranicznych, w tym 3 wystąpienia ustne oraz dwa staże naukowe w ośrodkach zagranicznych.

### OCENA MERYTORYCZNA PRACY

Rozdział 1. - WSTĘP (57 stron) stanowi wprowadzenie do tematyki badań opisanych w dysertacji i składa się z 9 podrozdziałów, a podrozdziały 1, 7 i 9 są dodatkowo rozbudowane. W rozdziale tym znajduje się 16 rysunków. W pierwszym podrozdziale (na 11 stronach) Doktorantka dokonała przeglądu aktualnego stanu wiedzy na temat tyrozynazy, między innymi jej budowy, aktywności i występowania. W kolejnych pięciu podrozdziałach (na prawie 10 stronach) Autorka omówiła proces melanogenezy. W podrozdziale siódmym Doktorantka opisała rolę tyrozynazy w patogenezie chorób. Najbardziej obszerny jest podrozdział 9 (32 strony), w którym Autorka opisuje różne inhibitory tyrozynazy, ich siłę i rodzaj hamowania. W tym podrozdziale Autorka omówiła zarówno naturalne, jak i syntetyczne inhibitory tyrozynazy. Najczęściej do tego podrozdziału Doktorantka odwołuje się przy omawianiu wyników badań. Opracowanie wstępu dysertacji wskazuje, że Autorka wykazała się znajomością podstaw teoretycznych, które były przedmiotem zrealizowanych prac eksperymentalnych.

Po WSTĘPIE teoretycznym Doktorantka sformułowała CEL PRACY, którym było „opracowanie nowych i wysoce aktywnych klas małowcząsteczkowych inhibitorów tyrozynazy



z *Agaricus bisporus* (pieczarki dwuzarodnikowej), które mogłyby znaleźć zastosowanie w zapobieganiu i/lub leczeniu schorzeń spowodowanych z nieprawidłową aktywnością tego enzymu, która objawia się zaburzeniami w pigmentacji skóry u ludzi.” W tym rozdziale Doktorantka nadmieniła, że realizowała badania do pracy doktorskiej w pięciu etapach.

Rozdział MATERIAŁY I METODY (18 stron) podzielony został na podrozdziały. W pierwszych trzech podrozdziałach Autorka przedstawiła spis odczynników stosowanych przy realizacji pracy, wykaz i struktury chemiczne związków użytych do badań oraz źródło do izolacji enzymu. Doktorantka realizując cel pracy korzystała ze związków zsyntezowanych w Zakładzie Chemii Organicznej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej w grupie badawczej dr hab. inż. Elżbiety Wojaczyńskiej oraz przez dr hab. inż. Tomasza Olszewskiego i dr inż. Waldemara Goldemana. W kolejnych podrozdziałach Doktorantka omówiła metody stosowane przy realizacji eksperymentów tzn. wyodrębniania i oczyszczenia tyrozynazy, oznaczania aktywności enzymu oraz zawartości białka w preparacie enzymatycznym. W następnych podrozdziałach opisana została metodyka badań kinetycznych, wyznaczania parametrów kinetycznych reakcji, określanie typu i mechanizmu inhibicji. Doktorantka zaznaczyła również, że modelowanie molekularne zostało wykonane przez naukowców z Zakładu Chemii Bioorganicznej na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej, a badania nad zahamowaniem procesu melanogenezy i proliferacji komórek zostały przeprowadzone przez dr J. Rossowską i współpracowników w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu. Pomiary aktywności enzymatycznej wobec standardowego substratu L-DOPY (L-3,4-dihydroksyfenylalaniny) i pomiary stężenia białka wykonywane były metodą spektrofotometryczną. Do oczyszczania enzymu Doktorantka stosowała frakcjonowanie siarczanem amonu oraz metody chromatograficzne (chromatografia żelowa, jonowymienna i oddziaływań hydrofobowych). Czystość preparatu białkowego sprawdzała przeprowadzając elektroforezę w warunkach denaturujących. Moim zdaniem cały rozdział MATERIAŁY I METODY został opracowany bardzo pobieżnie. Podrozdział 3.2.9. „Wyznaczanie parametrów kinetycznych reakcji” jest napisany dość chaotycznie, z użyciem zwrotów, które wprowadzają czytelnika w błąd np. zwrot „sporządzając drugorzędowe wykresy”. Moim zdaniem poprawnym określeniem byłyby wykresy wtórne lub następcze, gdzie dane do nich np. nachylenie otrzymujemy z wykresów pierwotnych, czyli w tym przypadku z wykresów Lineweavera-Burka. Według mnie wykresy powinny być opisane jako zależności np.  $K_m^{app} = f(I)$ , a nie  $K_m^{app}(I)$  (strona



81), w innych fragmentach pracy Autorka już używa zapisu poprawnego np.  $V_0 = f([E])$  (strona 116). Przy omawianiu sposobu wyznaczania stałych inhibicji brak jest oznaczenia (app), gdy  $K_m$  lub  $V_{max}$  są wyznaczane w obecności inhibitora. Wydaje mi się również, że lepiej byłoby zapisać stosunek  $\frac{K_m}{v_{app}}$ , tak jak w publikacji, w której Doktorantka jest współautorem, jako nachylenie linii (a) na wykresie Lineweavera-Burka.

W kolejnym rozdziale pracy, zatytułowanym WYNIKI I DYSKUSJA, Doktorantka na 64 stronach opisała przeprowadzone przez siebie badania i dokonała interpretacji wyników. Rozdział ten składa się z sześciu podrozdziałów, z których pięć jest jeszcze podzielonych. W rozdziale tym znajdują się 24 rysunki oraz 11 tabel. Omawianie wyników Autorka rozpoczęła od opisu projektowania nowych inhibitorów tyrozynazy, następnie omówiła pobieżnie izolację i kilkueapową procedurę oczyszczania enzymu z pieczarki dwuzarodnikowej. W wyniku zaplanowanej na podstawie przeglądu literaturowego i wykonanej procedury Doktorantka otrzymała oczyszczone białko o aktywności specyficznej 3265 U/mg. Czystość preparatu enzymatycznego została potwierdzona metodą elektroforezy SDS-PAGE. Przy opisie elektroforegramu brakuje jednak stężenia żelu, w którym prowadzony był proces elektroforezy. Pomimo, że celem pracy nie była izolacja i oczyszczanie enzymu to brak mi w tej części wykresów profili elucji białek. Następnym etapem badań było wyznaczenie parametrów kinetycznych reakcji utleniania L-DOPY katalizowanej przez tyrozynazę ( $K_m$  i  $V_{max}$ ). Wartość stałej Michaelisa dla tego substratu wyznaczona przez Doktorantkę wyniosła 0,36 mM, Autorka nie podała wartości odchylenia standardowego. Kolejnym etapem pracy były badania wpływu fosforoorganicznych pochodnych kumaryny, kromonu, pirydyny oraz 2-azanorbomanu na aktywność tyrozynazy grzybowej. Z dwudziestu przebadanych związków trzy były inhibitorami kompetycyjnymi, pięć - niekompetycyjnymi, natomiast pozostałe wykazywały mieszany typ inhibicji. Wszystkie okazały się raczej słabymi, odwracalnymi inhibitorami tego enzymu o milimolowych wartościach stałych inhibicji. Związek, który wykazywał największą aktywność inhibitorową był niekompetycyjnym inhibitorem o  $K_I = 0,08$  mM (związek 6). Otrzymane wyniki inhibicji były porównywane do wyników dla opisanego w literaturze inhibitora tego enzymu – kwasu kojowego, którego stałe inhibicji mieszanej wynosiły  $K_I = 0,011$  mM i  $K_{IS} = 0,026$  mM. Na rysunkach umieszczonych w pracy pokazane zostały wizualizacje oddziaływań wybranych związków z tyrozynazą, co stanowi ciekawe



uzupełnienie dyskusji wyników. Największą grupę związków przebadanych w ramach tej pracy stanowią aryłowe pochodne tiosemikarbazonu (31 związków). W związkach tych ugrupowanie tiosemikarbazydowe nie ulegało zmianie, natomiast były modyfikowane podstawniki R<sub>1</sub> i R<sub>2</sub>. Pięć z przebadanych związków nie było inhibitorami tyrozynazy grzybowej, a pozostałe odwracalnie hamowały aktywność enzymu (mam nadzieję, że w rozdziale 4.6.2.2. opisuje Autorka mechanizm reakcji inhibicji tyrozynazy przez aryłowe pochodne tiosemikarbazonu, a nie pochodne 2-azanorbornanu), przy czym jeden (związek 32) okazał się silnym kompetycyjnym inhibitorem tego enzymu. Stała inhibicji dla tego związku wynosiła  $0,17 \pm 0,01 \mu\text{M}$ , a jeszcze trzy z przebadanych związków miały stałe inhibicji mniejsze od  $1 \mu\text{M}$ . Dla tej grupy związków sprawdzono również procent zahamowania produkcji melaniny i proliferacji komórek mysiego czerniaka B16. Najsilniejszy z inhibitorów (związek 32) całkowicie hamował syntezę melanin, jednak wykazywał wysoką aktywność cytotoksyczną w stosunku do żywych komórek i zapobiegał ich proliferacji. Doktorantka przeanalizowała również wpływ struktury aryłowych pochodnych tiosemikarbazonu na ich aktywność inhibitorową wobec tyrozynazy grzybowej. Autorka nie stwierdziła bezpośredniej zależności między strukturą związku a typem hamowania aktywności enzymu. Zaobserwowała natomiast, że tiosemikarbazony podstawione w aromatycznym pierścieniu atomem halogenu w pozycji *orto*- hamowały słabiej aktywność tyrozynazy z pieczarek niż związki, w których atom halogenu znajdował się w pozycji *para*- i *meta*- (tabela 5).

W rozdziale PODSUMOWANIE Doktorantka przedstawiła wyniki przeprowadzonych badań w formie opisowej. Podzieliła rozdział na dwie części: (I) Izolacja i oczyszczanie tyrozynazy z *Agaricus bisporus*; (II) Badania inhibicyjne. Podział ten moim zdaniem nie był konieczny, bo jeśli chodzi o izolację i oczyszczanie nie uzyskałam tam żadnych informacji, które można określić jako podsumowanie.

W trakcie czytania dysertacji nasunęły mi się pewne pytania i proszę Autorkę pracy o ich wyjaśnienie:

- Przy omawianiu chromatografii kolumnowej napisała Pani kilkakrotnie, że „kolumnę wymywano 3 objętościami”. O jakie objętości chodzi?
- Zastanawia mnie, dlaczego przy omawianiu chromatografii jonowej nie podała Pani, przy jakim stężeniu roztworu NaCl został wyeluowany z kolumny aktywny enzym?



- W rozdziale MATERIAŁY I METODY podaje Pani, że pomiary były wykonywane w trzykrotnych powtórzeniach, a na wykresie jest jeden punkt, czy wartości pomiarowe zostały uśrednione?
- W jaki sposób na podstawie przedstawionych wykresów (np. rysunki 26, 30, 35, 40) wyliczyła Pani stałe hamowania? Brak jest w pracy odpowiednich równań matematycznych, a wykresy powinny spełniać funkcję ilustracyjną.
- Z wykresów Lineweavera-Burka stosując regresję liniową można wyliczyć wartości  $K_m$ ,  $V_{max}$  oraz  $K_m^{app}$  i  $V_{max}^{app}$ . Pani wyznaczała te wartości metodą regresji nieliniowej, pomimo wykreślenia wykresów Lineweavera-Burka, dlaczego?
- W pracy, co najmniej dwukrotnie napisała Pani, że „Szybkość początkową reakcji enzymatycznej ( $V_0$ ) wyznaczono z prostoliniowego odcinka wykresu postępu reakcji enzymatycznej metodą regresji liniowej. **W warunkach tych spełnione są kryteria**, według których reakcja jest I rzędu, a jej szybkość uzależniona jest od stężenia substratu [S]. Reakcja przebiega zgodnie z modelem Michaelisa-Menten [126].” (str. 78 i str. 89). Proszę o przybliżenie o jakie warunki chodzi?

W podsumowaniu recenzji stwierdzam, że dysertacja stanowi istotny wkład w badania nad poszukiwaniem nowych inhibitorów tyrozynazy. **W trakcie realizacji zaplanowanych badań Doktorantka osiągnęła stawiane sobie cele.** Część przedstawionych wyników badawczych była podstawą publikacji w renomowanych czasopismach naukowych i została już oceniona przez recenzentów, a część z nich zapewne zostanie wkrótce opublikowana.

Reasumując, stwierdzam, że praca doktorska pt. „MAŁOCZĄSTECZKOWE INHIBITORY TYROZYNAZY – PROJEKTOWANIE ORAZ BADANIE ODDZIAŁYWAŃ Z ENZYMEM” **spełnia ustawowe wymagania** określone w art.13 ust.1 Ustawy z dn. 14 marca z 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 nr 65, poz.595, z późniejszymi zmianami) i wnioskuję do Rady Wydziału Chemicznego, Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie Pani mgr inż. Ewy Wolińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.