

Ocena
**pracy doktorskiej mgr inż. Ewy Wolińskiej pt. „Małocząsteczkowe inhibitory tyrozynazy –
projektowanie oraz badanie oddziaływań z enzymem”**

Celem pracy doktorskiej mgr inż. Ewy Wolińskiej było przebadanie, a nie jak pisze Autorka w dysertacji, opracowanie czterech grup syntetycznych związków organicznych pod kątem ich zdolności do hamowania aktywności tyrozynazy pochodzenia grzybowego, izolowanej z pieczarki dwuzarodnikowej. Pierwszą grupę badanych związków stanowiły fosfonokwasy, pochodne kumaryny (2 związki) i kromonu (3 związki). Druga grupa badanych związków to fosfonowe i fosfinowe pochodne pirydyny (10 związków). Trzecią grupą były pochodne 2-azanorbornanu (5 związków). W skład czwartej grupy wchodziły tiosemikarbazony aldehydu benzooesowego i jego podstawionych w pierścieniu benzenowym analogów (11 związków), aldehydu 9-antracenowego (2 związki) oraz tiosemikarbazony acetofenonu, benzofenonu i fenylo-alkiloketonów z grupą karbonylową w α pozycji do pierścienia benzenowego (18 związków).

Wybór tych grup związków do badań nie był przypadkowy. Doktorantka przeprowadziła staranne studia literaturowe z zakresu inhibitorów tyrozynazy, z których wiedziała, że przedstawiciele poszczególnych grup, może tylko z wyjątkiem połączeń z układem 2-azanorbornanu, były badane na aktywność inhibicyjną tego enzymu. Szczególnie skrupulatnie poznała literaturę dotyczącą aktywnych pochodnych pirydynowych oraz tiosemikarbazonów. Pochodne pirydynowe takie jak kwas nikotynowy i pikolinowy zostały już przebadane nie tylko na aktywność inhibicyjną, ale także na aktywność antyproliferacyjną w stosunku do komórek ludzkiego czerniaka. Również połączenia z funkcją tiosemikarbazydową skutecznie hamują aktywność tyrozynazy i są stosowane w terapii nowotworowej.

Planowane do badań związki zostały pozyskane przez Doktorantkę od kolegów z Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej. Związki te mają ustaloną budowę, a dane strukturalne, głównie spektroskopowe, i ich synteza zostały już w dużej części opublikowane.

Plany badawcze zakładały nie tylko określenie zdolności hamowania aktywności tyrozynazy badanych związków, ale również określenia typu mechanizmu hamowania tego enzymu oraz wyznaczenie parametrów kinetycznych procesu inhibowania. Tak sformułowany cel badań i plan ich prowadzenia uważam za w pełni uzasadniony, tak pod względem poznawczym jak i praktycznego

zastosowania uzyskanych wyników. Tyrozynaza bowiem jest enzymem, który uczestniczy w biosyntezie wszelkich rodzajów melanin. Jest ona odpowiedzialna za utlenianie tyrozyny do dopachinonu w jednoetapowym procesie lub w dwuetapowym poprzez 3,4-dihydroksyfenyloalaninę (L-DOPA). Nadekspresja tyrozynazy przy braku kontroli pierwszych etapów biosyntezy melaniny prowadzi do nadprodukcji melaniny powodując hiperpigmentację skóry, piegi, plamy soczewicowate, a zwiększona produkcja melanin w melanocytach jest również początkową fazą zmian skóry prowadzących do czerniaka złośliwego, jednego z najgroźniejszych nowotworów. Zwiększona produkcja dopachinonu prowadzi także do uszkodzenia neuronów, a więc do chorób neurodegeneracyjnych: Parkinsona i Alzheimerera. Jednym ze sposobów zapobiegania przytoczonych powyżej chorób skóry jest kontrola aktywności tyrozynazy za pomocą inhibitorów. Inhibitory tyrozynazy mogą więc znaleźć zastosowanie praktyczne w terapii leczenia zaburzeń biosyntezy melanin, w przemyśle kosmetycznym do wybielania i upiększania skóry oraz w przemyśle spożywczym do przeciwdziałania brunatnieniu uszkodzonych owoców i warzyw.

Mgr Ewa Wolińska przed przystąpieniem do prezentacji wyników badań własnych w dysertacji, w części wstępnej, moim zdaniem zbyt długiej, przybliżyła obiekt badawczy którym była tyrozynaza. Omawia rolę tyrozynazy w fizjologii roślin, grzybów i ludzi. Szczegółowo prezentuje strukturę tyrozynazy z pieczarki dwuzarodnikowej i katalizowany przez nią proces utleniania tyrozyny do dopachinonu i dalsze procesy biosyntezy eumelanin i feomelanin. Na kolejnych stronach części literaturowej omówiona jest rola tyrozynazy w patogenezie chorób skóry, a więc hiperpigmentacji melazmy, a na koniec czerniaka. Podaje również przykłady chorób związanych z dysfunkcją tyrozynazy: hipopigmentacji i albinizmu. Kilkanaście następných rozdziałów poświęciła Doktorantka znanym inhibitorom tyrozynazy. Najpierw prezentuje inhibitory pochodzenia naturalnego, a więc polifenole, flawonoidy w tym głównie flawanole: kampferol i kwercetynę. Następne grupy naturalnych inhibitorów to hydrochinon i jego pochodne jak: mekwinol i β -arbutyna oraz stilbeny z rezweratrolem i oksyrezweratrolem. Bardzo szczegółowo omówiła trzy kolejne inhibitory tyrozynazy: kwas azelainowy, L-mimozynę oraz kwas kojowy. Ten ostatni związek był związkiem referencyjnym w badaniach na aktywność inhibicyjną w stosunku do tyrozynazy. Na zakończenie przeglądu znanych inhibitorów tyrozynazy zaprezentowała inhibitory syntetyczne poświęcając najwięcej uwagi związkom zawierającym atomy siarki: tiokarbamidom oraz tiosemikarbazonom a także inhibitorom fosforoorganicznym.

Oceniając przedstawiony w pracy przegląd literatury trzeba stwierdzić, że jest bardzo informatywny. Czytając go można bowiem uzupełnić swoją wiedzę na temat pigmentacji skóry, zaburzeń tego fizjologicznego procesu oraz o postępowaniu terapeutycznym niwelującym te schorzenia. Dostarcza również bardzo istotnych informacji o przebiegu procesu pigmentacji i roli tyrozynazy w tym procesie. Bardzo wiele informacji można znaleźć na temat mechanizmów inhibicji aktywności tyrozynazy oraz o naturalnych i syntetycznych inhibitorach melanogenezy.

Po wstępie literaturowym w dysertacji zamieszczona jest prezentacja struktur badanych związków a także metoda izolowania tyrozynazy z pieczarki dwuzarodnikowej i metodyka prowadzonych badań. Procedury badawcze zastosowane przy wykonywaniu pracy nie budzą moich zastrzeżeń.

Prezentację uzyskanych wyników omówiła w kolejności badanych grup związków. Badania pochodnych kumaryny i kromonu na aktywność inhibicyjną tyrozynazy wykazały, że są one mniej aktywne od referencyjnego kwasu kojowego. Największą zdolność hamowania aktywności tyrozynazy grzybowej wykazały pochodne kumaryny z N-butylo- α -fosfonoglicyną przy C-4 i grupą metoksyłową przy C-8 oraz pochodna kromonu z tym samym podstawnikiem fosforoorganicznym w pozycji 2. Badania kinetyki procesu wykazały, że połączenia są odwracalnymi inhibitorami tyrozynazy (inhibicja mieszana typu I), a więc związki te wykazują wyższe powinowactwo w stosunku do wolnej formy enzymu aniżeli do kompleksu enzym – substrat. Interesujących danych potwierdzających słabą aktywność badanych pochodnych dostarczyła analiza komputerowa oddziaływań cząsteczek tych związków z miejscem aktywnym tyrozynazy. Analiza ta wykazała, że związki te nie wiążą się w miejscu wiązania substratu, a pierścienie heteroatomowe są umiejscowione u wejścia do wnęki katalitycznej. Analiza ta wykazała także, że grupa fosfonowa nie oddziałuje z jonami Cu^{2+} w miejscu aktywnym enzymu.

Badane fosforoorganiczne pochodne pirydyny okazały się również słabszymi inhibitorami od kwasu kojowego. Wszystkie związki charakteryzowały się stałą inhibicji na poziomie milimolowym. Najbardziej hamowały aktywność tyrozynazy pochodne pirydyny z podstawnikiem N-benzylfosfinoglicyną przy C-2 oraz z grupą α -hydroksymetylodifenylfosfinotlenkową przy C-3. Pierwszy związek okazał się inhibitorem niekompetycyjnym, a drugi inhibitorem mieszanym typu I. Dwa spośród 10 połączeń, 1 z podstawnikiem N-benzylometylofosfinoglicyną przy C-3 i drugi z N-butylofosfinofenyloglicyną również przy C-3 okazały się inhibitorami niekompetycyjnymi. Analiza komputerowa potwierdziła również niekompetycyjny model inhibicji tyrozynazy najbardziej aktywnego związku. Badania oddziaływań cząsteczek pozostałych związków z miejscem aktywnym enzymu wskazały, że utrudniają one podejście substratu do miejsca aktywnego.

Analiza wyznaczonych stałych inhibicji (k_i) dla grupy pochodnych azanorbornanu wskazała, że wszystkie połączenia wykazują inhibicję tyrozynazy na poziomie milimolowym. Najbardziej aktywnym inhibitorem okazał się związek z grupą metylofosfonową przy C-3. Oznaczono dla niego mieszany typ inhibicji typu I. Interesującym jest fakt, że dla związku z sulfonoamidowym podstawnikiem oznaczono kompetycyjny model inhibicji, a dla pochodnej z ugrupowaniem sulfonamidowym i z grupą metylową przy C-4 pierścienia benzenowego oznaczono niekompetycyjny model inhibicji. Analiza komputerowa oddziaływań cząsteczek badanych związków z miejscem aktywnym tyrozynazy potwierdziła kompetycyjny sposób inhibicji pierwszego związku

i niekompetycyjny drugiego związku. Analiza tych oddziaływań wykazała również możliwość wiązania się grupy fosforoorganicznej z jonami Cu^{2+} .

Wszystkie badane tiosemikarbazony są odwracalnymi inhibitorami tyrozynazy co oznacza, że nie zmniejszają ilości aktywnego enzymu a powodują tylko zmniejszenie szybkości utleniania substratu (L-DOPA). Porównanie obliczonych i zamieszczonych w Tabeli 5 stałych inhibicji poszczególnych tiosemikarbazonów ze stałą związku referencyjnego wskazuje, że aktywności badanych związków są porównywalne do aktywności kwasu kojowego i mają wartości wyrażone w mikromolach. Ponad połowa badanych połączeń wykazała się większą siłą hamowania niż kwas kojowy. Tiosemikarbazony aldehydu benzoowego i jego chlorowcopodstawionych analogów wykazała większą aktywność niż kwas kojowy, ale mniejszą niż tiosemikarbazon acetofenonów. Interesujące, że tiosemikarbazony innych alkilofenyloketonów znacznie słabiej inhibowały tyrozynazę niż tiosemikarbazon acetofenonów, a niektóre z nich nie wykazywały wogóle efektu inhibicji. Pochodne acetofenonów wykazały kompetycyjny typ inhibicji a tiosemikarbazon benzofenonu mieszany typu I. Ogromna większość badanych tiosemikarbazonów wykazała mieszany typ inhibicji.

Autorka w zakończeniu omawiania wyników badań tiosemikarbazonów analizowała wpływ podstawników chlorowcowych tak pod względem rodzaju chlorowca jak i położenia w pierścieniu benzenowym na aktywność związku. Z porównania stałych inhibicji poszczególnych izomerów wyprowadziła wniosek, że wprowadzenie chlorowca do pierścienia benzenowego w pozycję *para* i *meta* skutkuje zwiększeniem siły inhibitora, a w pozycję *orto* osłabia. Analiza wpływu rodzaju podstawnika alkilowego w tiosemikarbazonach fenyloalkiloketonów doprowadziła Autorkę do wniosku, że zmiana grupy metylowej na inny podstawnik alkilowy skutkowała znacznym obniżeniem efektywności inhibicyjnej związku.

Analiza komputerowa oddziaływań pomiędzy atomami cząsteczki najbardziej aktywnego inhibitora tej grupy, a miejscem aktywnym tyrozynazy wskazała, że atom bromu w pozycji *para* w pierścieniu benzenowym oddziałuje elektrostatycznie z kationami Cu^{2+} co by tłumaczyło zwiększoną aktywność inhibicji enzymu przez tą pochodną.

Na zakończenie omawiania uzyskanych wyników Autorka prezentuje bardzo interesujące rezultaty badań wykonanych w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej we Wrocławiu, których celem było sprawdzenie w badaniach *in vitro* efektywności procesu tworzenia melaniny w obecności tiosemikarbazonów oraz ich cytotoksyczności w stosunku do komórek nowotworowych mysiego czerniaka (B16). Uzyskane wyniki wskazują, że przy stężeniu 10 μmoli wszystkie badane związki bardziej hamowały wytwarzanie melanin niż referencyjny kwas kojowy. Najbardziej efektywnie czyniły to tiosemikarbazony aldehydów chlorowcobenzoowych oraz tiosemikarbazony prawie wszystkich ketonów. Wyniki te zostały potwierdzone w badaniach wyznaczania IC_{50} tego procesu. Badania hamowania proliferacji komórek B16 wykazały największą efektywność

tiosemikarbazonów chlorowcoaldehydów, a umiarkowaną kwasu kojowego i tiosemikarbazonów ketonów. Szkoda, że nie wykonano takich badań na zdrowych komórkach ludzkiej skóry. Myśląc bowiem o zastosowaniu tych związków w wyrobach kosmetycznych do ograniczania wytwarzania melaniny trzeba będzie takie badania na pewno wykonać. Cytotoksyczność badanych związków wobec zdrowych komórek może być zupełnie inna niż wobec badanych nowotworowych.

Oceniając przedstawione powyżej przez mgr Ewę Wolińską wyniki stwierdzam, że mają one dużą wartość poznawczą. O ich dużej wartości naukowej świadczy to, że zostały już zaprezentowane w trzech oryginalnych pracach zamieszczonych w renomowanych czasopismach: *Bioorganic Chemistry* oraz *Chemistry and Biodiversity*. Podobało mi się to, że wyniki z badań kinetycznych były weryfikowane z wynikami komputerowej analizy oddziaływań cząsteczek badanych związków z miejscem aktywnym tyrozynazy. Trzeba pochwalić Doktorantkę za to to, że obok właściwości inhibicyjnej tyrozynazy określono również cytotoksyczność badanych związków. Najbardziej aktywne inhibitory mogą znaleźć zastosowanie praktyczne, jednak tylko wtedy kiedy nie będą cytotoksyczne w stosunku do komórek zdrowych.

Oceniając stronę edytorską pracy trzeba stwierdzić, że jest ona napisana dobrym polskim językiem. Z dostrzeżonych błędów chciałbym zwrócić uwagę na niektóre niefortunne sformułowania: zamiast „tyczy się to” lepiej pisać „dotyczy to”, a zamiast o „izolacji” pisać o „izolowaniu”. Ponadto polifenole zawierają wiele grup hydroksylowych, a nie fenolowych, a stilbeny to są 1,2-dipodstawione grupami fenyłowymi eteny, a nie pisać, że „struktura stilbenu składa się z podwójnego wiązania dietylenowego dipodstawionego grupą benzylową”. We wzorze aldehydu benzoesowego brakuje atomu wodoru (Rysunek 14), w literaturze nr. 141 brak jest nazwiska autora, a w 139 stron artykułu.

Podsumowując moją ocenę pracy doktorskiej mgr Ewy Wolińskiej stwierdzam, że wyniki przeprowadzonych w ramach tej pracy badań mają dużą wartość naukową. Moja ocena opracowania ich w dysertacji doktorskiej jest również pozytywna. W świetle tego stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska spełnia wymogi stawiane przez Ustawę o stopniach naukowych i tytule naukowym i proponuję Radzie Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej dopuszczenie jej Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

