



Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II  
Wydział Biotechnologii i Nauk o Środowisku  
**Interdyscyplinarne Centrum Badań Naukowych**  
ul. Konstantynów 1J, 20-708 Lublin  
tel.+48 81 454 56 38, fax +48 81 445 45 51  
e-mail: [elzbieta.stefaniak@kul.pl](mailto:elzbieta.stefaniak@kul.pl)

Lublin, 15-06-2018

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Rafała Kuzioły  
„Oddziaływanie wybranych leków na albuminę obecną w moczu ludzkim”  
wykonanej pod kierunkiem dr hab. Barbary Marczewskiej, prof. KUL  
w Katedrze Chemii Analitycznej Środowiska Instytutu Inżynierii Środowiska KUL

Poszukiwanie i doskonalenie metod analitycznych związanych z diagnostyką medyczną jest niezwykle ważne zarówno w zakresie badań podstawowych, jak i w odniesieniu do ich aplikacyjności w diagnozowaniu chorób. Mocz jest jednym z płynów ustrojowych najczęściej stosowanych do oceny zdrowia pacjenta, ale jednocześnie jest to materiał bardzo zróżnicowany i trudny pod względem analitycznym, biorąc pod uwagę choćby różnice osobnicze. Obecność białka w moczu jest jednym z symptomów wielu chorób, nie ma zatem wątpliwości, że poprawne z punktu widzenia analitycznego oznaczenie białka w matrycy o skomplikowanym składzie (płyny fizjologiczne) jest interesującym wyzwaniem, szczególnie w sytuacji, gdy pojawiają się dodatkowe czynniki interferujące w postaci farmaceutyków.

Głównym celem pracy doktorskiej mgr. Rafała Kuzioły było zbadanie wpływu wybranych związków terapeutycznych na oznaczenie albuminy ludzkiej osocza (*human serum albumin*, HSA) w modelowych i naturalnych próbkach moczu za pomocą natywnej elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (*polyacrylamide gel electrophoresis*, PAGE). W badaniach wstępnych zastosowano cztery związki lecznicze (kaptopril, werapamil, gentamycynę i ketoprofen), a następnie rozszerzono panel badanych związków o siedem kolejnych. Dodatkowym celem pracy w następnym etapie była próba ustalenia, jaki mechanizm odpowiada za zakłócony obraz elektroforetyczny albuminy w moczu ludzkim w obecności wybranych związków leczniczych.

Dysertacja liczy 118 stron tekstu opatrzonego rysunkami (54) oraz tabelami (15), wspartego licznymi cytatami z literatury naukowej (176). Doktorant zamieścił też zestawienie swojego dorobku naukowego oraz spis akronimów i skrótów. Dostępne jest także streszczenie w języku polskim i angielskim. Układ pracy jest klarowny, z tradycyjnym podziałem na: wstęp i cel pracy, część literaturową, część doświadczalną, dyskusję wyników oraz podsumowanie i wnioski końcowe.

We wstępie nakreślone są uwarunkowania, które stanowiły motywację do podjęcia badań w ramach niniejszej pracy. W skład moczu wchodzi między innymi albumina, a jej podwyższona zawartość wskazuje na możliwe uszkodzenie nerek. Zadanie badawcze, jakie postawił sobie Doktorant, to weryfikacja wpływu związków biologicznie czynnych, w postaci leków uznawanych za nefrotoksyczne i nefroprotektoryjne, ale też potencjalnie wszystkich leków, na wyniki oznaczania albuminy w rzeczywistych i modelowych próbkach moczu.

Część literaturowa (Doktorant używa pojęcia „część teoretyczna”, co moim zdaniem nie jest poprawne) stanowi pięć rozdziałów, z których pierwsze dwa opisują właściwości albuminy ludzkiej i jej wykorzystanie w medycynie. W kolejnych dwóch rozdziałach Doktorant dokonał krótkiej charakterystyki metod analitycznych stosowanych do oznaczania albuminy w moczu oraz przedstawił opisane w literaturze czynniki zakłócające te pomiary. Spośród wszystkich wymienionych metod Doktorant poświęcił więcej uwagi elektroforezie żelowej (PAGE) i wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), zaś najbardziej rozbudowany jest opis metod immunochemicznych. Z tego punktu widzenia ważne jest sięganie także po metody alternatywne, szczególnie że oznaczanie albuminy w moczu jest zadaniem trudnym dla analityka. Świadczą o tym doniesienia literaturowe o podejmowanych próbach standaryzacji tego procesu oraz wypracowania metod i materiałów referencyjnych, co potwierdza złożoność tego problemu analitycznego.

Natywna elektroforeza żelowa PAGE, która dla Doktoranta jest techniką wiodącą, była z powodzeniem stosowana do określenia zawartości albuminy w próbkach moczu, co zostało poparte odpowiednimi cytowaniami. Jest to ważne wsparcie dla późniejszej interpretacji wyników badań opisanych w części doświadczalnej. Pewien niedosyt sprawia brak w tym rozdziale porównania wymienionych technik badawczych (choćby w formie tabeli) pod kątem zakresu liniowego, granic oznaczalności oraz rozpoznanych ograniczeń ich stosowalności, zwłaszcza że forma albuminy jest w tym przypadku znacząca. Szkoda, że Doktorant nie sięgnął do publikacji przeglądowej *Methods of albumin estimation in clinical biochemistry: Past, present, and future* (Clinica Chimica Acta 469, 2017), która moim zdaniem byłaby bardzo pomocna. Zachęcałabym – przy okazji prowadzenia dalszych badań w tym zakresie – do przygotowania krytycznej pracy przeglądowej dotyczącej tego zagadnienia, biorąc pod uwagę bogactwo literatury przedmiotu. Część literaturową dysertacji zamyka rozdział zawierający krótką charakterystykę leków wybranych do badań w ramach pracy doktorskiej.

Część doświadczalna jest zredagowana według ogólnie przyjętych zasad. Pierwsze dwa rozdziały to zestawienie stosowanych odczynników i aparatury. W kolejnych rozdziałach na początku omówione są techniki badawcze stosowane w pracy, z uwzględnieniem zastosowanych parametrów, a w dalszej kolejności zaprezentowane są wyniki. Pomiary elektroforetyczne są opisane dość szczegółowo, aczkolwiek w tym przypadku (a zwłaszcza przy opisie mikroelektroforezy kapilarnej) przydatna byłaby dokumentacja fotograficzna układów pomiarowych, szczególnie iż jest to proces skomplikowany i wieloetapowy. Mikroelektroforeza została wykorzystana jako technika do wstępnego rozpoznania zjawiska oddziaływania składników matrycy (leków) na elektroforetyczne oznaczanie albuminy w moczu modelowym (bufor fosforanowy o pH 6,5). Na tym etapie przebadano cztery substancje lecznicze (kaptopril, werapamil, gentamycynę i ketoprofen), z których dwie (kaptopril i werapamil) zmieniły obraz elektroforetyczny albuminy w modelowym roztworze moczu. Na podstawie zmian pola piku densytometrycznego Doktorant wnioskował o wpływie (lub jego braku) obecności leków na obraz elektroforetyczny albuminy, podając wartości średniej, odchylenia standardowego, mediany, wartość maksymalną i minimalną oraz rozstęp. W mojej opinii zastosowana tutaj statystyczna ocena uzyskanych wyników nie jest odpowiednio ukierunkowana. Wydaje się, że zasadne byłoby użycie do oceny jakości wyników choćby prostego testu istotności.

Elektroforeza płytowa PAGE była zastosowana jako technika ilościowego oznaczania poziomu albuminy w moczu, w oparciu o zależność szerokości pasma albuminy na wybarwionym żelu, którego obraz cyfrowy został poddany obróbce za pomocą programu komputerowego. Szkoda, że Doktorant nie umieścił w pracy zdjęć przedstawiających uzyskane rozdziały elektroforetyczne, choćby kilku wybranych dla zilustrowania eksperymentu. W mojej ocenie, obraz cyfrowy i jego parametry (kontrast, jasność) mają istotny wpływ na analizę graficzną obrazu. Elektroforegram po sfotografowaniu zostaje poddany obróbce graficznej i zamieniony na wykres densytometryczny. Analiza obrazu (i generowanie krzywej densytometrycznej) jest wprawdzie wykonana za pomocą specjalistycznego oprogramowania, ale brakuje tu prób standaryzacji tej metodyki, choćby w ograniczonym zakresie. Elektroforeza nie jest techniką powszechnie stosowaną do oznaczeń *stricte* ilościowych (stosowana jest bardziej w badaniach porównawczych), ale nawet w tej sytuacji wybrane elementy walidacji są moim zdaniem potrzebne. Co prawda Doktorant nie stosuje elektroforezy do wyznaczania stężenia albuminy w próbkach rzeczywistych, a praca jest ukierunkowana bardziej na obserwację oddziaływań albumina-interferenty i ich wpływ na wysokość sygnału, niemniej jednak kwestia powtarzalności odczytu sygnału ma istotne znaczenie. Jestem przekonana, że Doktorant, będąc absolwentem studiów podyplomowych na Wydziale Chemii UAM w Poznaniu na kierunku 'Analityka Chemiczna', wraz z zaliczeniem kursu „Metrologia Chemiczna”, ma świadomość, jak ważna jest metrologiczna ocena jakości uzyskanych wyników.

Do niewątpliwych osiągnięć Autora opisanych w pracy należy zweryfikowanie wpływu matrycowego dziewięciu substancji leczniczych o różnym działaniu na układ moczowy (nefrotoksyczne, nefroprotekcyjne, obojętne). Dobre stężenia odpowiadały ilości leku wydalanej w postaci niezmienionej w moczu pacjentów leczonych dawkami standardowymi. Uzyskane wyniki wskazują na następujące zależności: aspiryna, ampicylina, cefuroksym, metformina i 2,4-tiazolidinedion nie zakłócają oznaczenia albuminy techniką elektroforezy PAGE; cisplatyna i metotreksat powodują pozorne zaniżenie stężenia albuminy w próbce, zaś w obecności kaptoprilu i werapamilu stężenia albuminy w moczu są fałszywie podwyższone. Wartości pola powierzchni piku krzywej densytometrycznej reprezentującego monomer HSA podane są w tabelach 8-14, razem z wartościami (prawdopodobnie) odchylenia standardowego, chociaż nigdzie nie ma wyjaśnienia, jaka wartość stoi za znakiem „±”. Wynikałoby z tego, że pomiary były wykonywane w powtórzeniach, jednakże nie ma informacji, ile niezależnych oznaczeń (powtórzeń) zostało wykonanych. Co ciekawe, obniżenie (w przypadku cisplatyny i metotreksatu) odczytu sygnału elektroforetycznego albuminy jest jednakowe dla dwóch różnych stężeń leku; podobnie jest w sytuacji podwyższenia sygnału (wobec kaptoprilu i werapamilu); warto byłoby podjąć dyskusję na temat zaobserwowanego trendu.

Należy podkreślić istotne znaczenie podjętej przez Doktoranta próby częściowej choćby walidacji użytej metodyki poprzez zastosowanie materiału odniesienia *Standard reference material 927d Bovine Serum Albumin* (NIST). Materiały odniesienia mają fundamentalne znaczenie dla walidacji metodyki analitycznej, niezależnie od stosowanych technik badawczych. Ze względu na brak albuminy ludzkiej (HSA), Doktorant zdecydował się na zastosowanie albuminy wołowej (*bovine serum albumin*, BSA). Do oceny wiarygodności oznaczeń zawartości albuminy w obecności wybranych leków, spośród dziewięciu

analizowanych związków wybrano układ BSA-meformina i BSA-2,4-tiazolidinedion. Oba związki nie wpływały na obraz elektroforetyczny albuminy ludzkiej, co potwierdziło się także w przypadku zastosowania BSA jako materiału odniesienia. Zastanawiające jest, co stało za wyborem tych dwóch związków spośród wszystkich zastosowanych do badań modelowych. Z kolei zastosowanie matrycy rzeczywistej (mocz ludzki) z dodatkami wybranych leków (kaptoprilu, aspiryny, ampicyliny, cefuroksymu) potwierdziło również wcześniejsze obserwacje, że wybrana metodologia pozwala wykazać zakłócenia obrazu elektroforetycznego albuminy, również przy bardziej skomplikowanej matrycy. Podobnie jak w badaniach modelowych, jedynie kaptopril spowodował podwyższenie wyniku.

W dalszej części dysertacji Doktorant opisał badania ukierunkowane na poznanie mechanizmu oddziaływania interferentów z albuminą w celu wyjaśnienia zaobserwowanych zakłóceń w obrazie elektroforetycznym. Do badań zastosowano spektrofotometrię UV-Vis, spektroskopię dichroizmu kołowego, FTIR oraz spektroskopię ramanowską.

Pomiary UV-Vis wykonano dla układów albumina-lek, przy czym do badań wybrano te, które nie wpływały na wynik elektroforezy (ampicylina, metformina, 2,4-tiazolidinedion), powodowały wynik zaniżony (cisplatyna, metotreksat) lub podwyższony (kaptopril, werapamil). Brakuje informacji, co spowodowało odrzucenie pozostałych dwóch badanych wcześniej preparatów (aspiryna i cefuroksym). Przebieg widm absorpcyjnych w zakresie 190-500 nm trzech spośród badanych leków (ampicylina, metformina, 2,4-tiazolidinedion) nie wykazał żadnych zmian w obecności albuminy, podczas gdy widma pozostałych czterech preparatów ulegały zmianie w obecności albuminy, co zdaniem Doktoranta może świadczyć o powstawaniu kompleksu albumina-lek. W dalszej części przedstawiono widma absorpcyjne w tym samym zakresie długości fali dla układów albumina-barwnik (CBB, *Coomassie Brilliant Blue R-250*) oraz albumina-lek-barwnik. Na podstawie zmian widm absorpcyjnych UV-Vis w układzie albumina-barwnik wyznaczono stosunek stężeń albuminy do barwnika (1:2) na potrzeby następnej serii eksperymentów, badając widma absorpcyjne układów albumina-lek-barwnik. Spośród badanych związków wybrano te, które mają fałszywie pozytywny lub fałszywie negatywny wpływ na oznaczanie poziomu albuminy, a jednocześnie ich widmo absorpcyjne ulega zmianie w obecności albuminy. W każdym z czterech przypadków dodatek barwnika spowodował obniżenie intensywności pasm absorpcyjnych obserwowanych dla układów albumina-lek. Podjęte w tym kierunku badania uważam za celowe i ważne z punktu widzenia poznania mechanizmu oddziaływania interferentów dla badanych układów pomiarowych.

Spektroskopia dichroizmu kołowego została zastosowana do oznaczenia struktury drugorzędowej albuminy bez i w obecności leków (kaptoprilu, cisplatyny) powodujących zafałszowany obraz elektroforetyczny. Wyniki wskazują na zmianę procentowego udziału  $\alpha$ -helisy w drugorzędowej strukturze albuminy pod wpływem zarówno cisplatyny (spadek) jak i kaptoprilu (wzrost). Spektroskopia FTIR znalazła zastosowanie do wyznaczenia procentowego udziału  $\alpha$ -helisy,  $\beta$ -kartki,  $\beta$ -skrętu oraz kłębka statystycznego w strukturze drugorzędowej albuminy oraz zmian zachodzących pod wpływem badanych leków i barwnika CBB. Warto podkreślić, że ostatnio w literaturze pojawiły się bardzo liczne publikacje dotyczące wyznaczania udziału poszczególnych komponentów drugorzędowej struktury białek z widma FTIR. Niemniej jednak badania te nie są w żadnym stopniu trywialne i wymagają od badacza pewnego doświadczenia i swoistej

intuicji naukowej przy wyborze składowych oraz ich dopasowania do oryginalnego widma. Zastosowanie tej metodologii w pracy doktorskiej to niewątpliwie duży plus dla Doktoranta. Wykonane zostały pomiary albuminy w roztworze buforowym bez i z dodatkiem wybranych leków (ampicyliny, metforminy, 2,4-tiazolidinedionu, cisplatyny, metotreksatu, kaptoprilu i werapamilu). W dalszej kolejności przebadano analogiczne jak wyżej układy albumina-lek, ale z dodatkiem barwnika CBB (w dwóch różnych stężeniach). Wybrana metodologia jest odpowiednia do zadania badawczego, niemniej jednak przydatna byłaby także informacja na temat kalibracji czy standaryzacji pomiarów; brakuje także krytycznego spojrzenia na wyniki choćby procentowego udziału  $\alpha$ -helisy w drugorzędowej strukturze albuminy w badanych układach, wyznaczone za pomocą obu technik. Z kolei widma ramanowskie były zbyt mało zróżnicowane i siłą rzeczy nie wniosły istotnego wkładu w wyjaśnienie mechanizmu badanych zjawisk.

W rozdziale poświęconym dyskusji zaprezentowanych wcześniej wyników postawiono hipotezę wyjaśniającą zmiany zachodzące w elektroforetycznym obrazie albuminy w próbkach moczu modelowego i rzeczywistego pod wpływem obecności niektórych leków. Jak wynika z przeprowadzonych badań i danych literaturowych, pozorne zmniejszenie lub zwiększenie stężenia albuminy w badaniu elektroforetycznym może wynikać z powstawania układów kompleksowych lek–albumina wpływających na zmianę konformacji albuminy w warunkach eksperymentu, co z kolei zmienia zdolność do wiązania cząsteczek barwnika CBB. Doktorant odniósł swoje obserwacje do odpowiednich cytowań, wskazując na analogiczne zależności opisane w literaturze światowej. W części „Podsumowanie i wnioski końcowe” zawarte są konkluzje stanowiące odpowiedzi na postawione w ramach celu pracy pytania.

W czasie lektury dysertacji nasunęły mi się jeszcze następujące uwagi krytyczne i pytania:

1. Modelowy roztwór moczu jest dosyć zubożony (bufor fosforanowy, pH 6,5) – co stało za wyborem tego składu, biorąc pod uwagę różnorodność modelowych układów w literaturze?
2. Wyjaśnienia wymaga rysunek 17, gdzie są dwie krzywe kalibracyjne, i rysunek 18 przedstawiający analizę reszt – żaden z nich nie został opatrzony odpowiednim komentarzem w tekście rozprawy, nie wiadomo, w jakim celu zostały umieszczone.
3. Zaskakujący jest brak konsekwencji co do formy prezentowania wyników z elektroforezy płytowej. Dla trzech badanych leków wyniki zaprezentowane są w tabeli, z podaniem odczytanych wartości pola pod pikiem oraz (prawdopodobnie) odchylenia standardowego, dla dwóch kolejnych – wyłącznie wykres, a ostatnie cztery związki są reprezentowane zarówno w tabeli, jak i na wykresie. Jaki cel przyświecał takiej prezentacji wyników?
4. Podobnie jest przy opisie wyników spektroskopowych – np. w podpisie do tabeli 16 podane jest „Procentowy udział  $\alpha$ -helisy HSA z roztworu o stężeniu 50 mg/l w buforze fosforanowym o pH 6,5 oraz HSA o stężeniu 50 mg/l w buforze fosforanowym o pH 6,5 w obecności 75 mg/l kaptoprilu, 40 mg/l cisplatyny i 100 mg/l metotreksatu” chociaż tabela zawiera wyniki wyłącznie dla kaptoprilu i cisplatyny.
5. Mam także zastrzeżenia co do edycji rozprawy doktorskiej, jak choćby losowe stosowanie spacji między liczbą a jednostką, pomimo generalnie przyjętej zasady stosowania pojedynczej spacji. Zdarzają się także zdania niepoprawnie sformułowane czy błędy w pisowni.

W podsumowaniu chciałabym podkreślić, że postawione przez Doktoranta cele pracy doktorskiej w zestawieniu z opisanymi wynikami badań należy uznać za zrealizowane. Wykazano, że na podstawie pomiarów elektroforetycznych można ustalić, które z przebadanej grupy związków wpływają na wynik oznaczenia zawartości albuminy ludzkiej w modelowych i naturalnych roztworach moczu, a dodatkowo zaproponowano hipotezę wyjaśniającą mechanizm obserwowanych interferencji. Przytoczone przeze mnie wcześniej wątpliwości i zastrzeżenia nie podważają mojej pozytywnej oceny przedstawionej rozprawy. Postawione przez Doktoranta tezy zostały właściwie udokumentowane, a część zaprezentowanych w dysertacji wyników została już opublikowana w pracy: Rafał Kuzioła, Barbara Marczevska, Krzysztof Marczewski, *Captopril apparently increase and cisplatin apparently decrease human albumin concentration in artificial urinary solutions*, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 31 (2017). Dotychczasowy dorobek naukowy Doktoranta obejmuje 2 artykuły w czasopiśmie z listy *Journal Citation Reports* (JCR), 7 rozdziałów w monografiach, 9 pozostałych artykułów, zarówno w języku polskim jak i w angielskim oraz 35 wystąpień konferencyjnych.

Biorąc pod uwagę powyższe stwierdzam, że przedstawiona rozprawa spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim w świetle obowiązujących przepisów (*Ustawa z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z uzupełnieniami*) i wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr. Rafała Kuzioły do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

