



KATEDRA CHEMII I BIOCHEMII KLINICZNEJ

60-806 Poznań
ul. Rokietnicka 8
Centrum Biologii Medycznej

Sekretariat: tel.: 061 854 77 00
fax: 061 854 77 02
Kierownik: tel.: 061 854 77 01
e-mail: iskra@ump.edu.pl

Ocena rozprawy doktorskiej

**pt.: „Oddziaływanie wybranych leków na albuminę
obecną w moczu ludzkim”**

mgr Rafała Kuziola

z Instytutu Inżynierii Środowiska Katolickiego Uniwersytetu Lubelskiego

Promotor: Dr hab. Barbara Marczevska, prof. KUL

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi próbę wyjaśnienia współdziałania albuminy, jednego z najważniejszych białek osocza, z lekami wprowadzanymi do organizmu człowieka podczas terapii. Zagadnienie to jest istotne ze względu na występujące w organizmie człowieka interakcje czynników endogennych i egzogennych, znaczenie relacji ich stężeń i form, w jakich występują lub są podawania. Parametrem ocenianym w rozprawie jest albumina, jej stężenie w moczu i współdziałanie z lekami. Doktorant oparł swe założenia badawcze na spodziewanym wpływie leków stosowanych w leczeniu chorób nerek na wydalanie albuminy z moczem. Dzięki działaniu bariery filtracyjnej, w prawidłowym moczu znajduje się bardzo niewiele albumin, gdyż zwykle zatrzymywane są we krwi. Obecność ogólnie białka, w tym albuminy, w moczu ma istotną wartość diagnostyczną i wskazuje na prawidłową bądź pogarszającą się pracę nerek. Białkomocz jest ważnym objawem schorzeń nerek, może pojawiać się również w schorzeniach pozanerkowych, a jego oznaczanie ma liczne zastosowania diagnostyczne. Pozwala na uzyskanie informacji o charakterze i nasileniu zmian chorobowych nerek, umożliwia monitorowanie przebiegu terapii, między innymi zespołu nerczycowego. Białkomocz pojawia się w stanach gorączkowych, po przegrzaniu lub przemarznięciu organizmu, dużym wysiłku fizycznym, stresie. Wczesne stany chorób nerek, jak uszkodzenie cewek nerkowych rozpoznaje się oznaczając mikrobiałkomocz. Badanie białkomoczu

sprawdza się często do oznaczenia albuminurii, której wartości ocenia się w zależności od ilości albuminy wydalanej z moczem i określa jako normoalbuminurię (<30 mg/dobę), mikroalbuminurię (30-300 mg/dobę) lub makroalbuminurię (>300 mg/dobę). Zakładając słuszność hipotezy przyjętej przez Doktoranta należy spodziewać się wpływu leków zarówno nefrotoksycznych jak i nefroprotekcyjnych na funkcje filtracyjne nerek wyrażające się zaburzonym wydalaniem albuminy lub wpływem na jej stężenie w moczu.

Teoretyczne założenia rozprawy przedstawione zostały w części obejmującej 30 stron, w której znalazła się charakterystyka biochemiczna i fizjologiczna ludzkiej albuminy, w tym struktura ze składem aminokwasowym i obecnością domen odpowiadających za zmiany konformacyjne i wiązanie ligandów oraz główne funkcje tego białka. Przedstawione zostały, wprawdzie krótko, najważniejsze sytuacje kliniczne wymagające zastosowania albuminy ludzkiej w leczeniu chorób manifestujących się niedoborem białka całkowitego we krwi. Więcej uwagi poświęcono albuminie oznaczanej w osoczu, jako parametrowi, którego zmiany stężenia i modyfikacje struktury wskazują na występowanie stresu oksydacyjnego, stanu zapalnego czy hiperglikemii prowadzących do dysfunkcji tego białka w krążeniu. Wskazano na istotną rolę albuminy w wiązaniu i transporcie leków we krwi, procesów wpływających na ich dostępność i działanie terapeutyczne. Przechodząc do filtracji nerkowej i pojawienia się w moczu albuminy i innych białek charakterystycznych dla osocza, Doktorant wskazał kliniczne sytuacje, w których pojawiają się zwiększona albuminuria lub jawny białkomocz. W tej części opisu (strona 18) zastosował określenie „albuminuria” dla mikroalbuminurii, co jest mylące ze względu na udział tego określenia we wszystkich typach wydalania albuminy z moczem. Poprawnym i prostszym rozwiązaniem byłoby usunięcie go z nawiasu lub wprowadzenie tam innego: „umiarkowanie zwiększona albuminuria” przy mikroalbuminurii i konsekwentnie „jawny białkomocz” przy makroalbuminurii.

W kolejnej części wstępu Doktorant opisuje szczegółowo metody oznaczania albuminy w moczu, w tym elektroforezę na żelu poliakrylamidowym, chromatografię cieczową, testy immunologiczne, liczne metody spektralne, w tym spektrometrię mas z plazmą indukcyjnie sprzężoną. W rutynowej praktyce klinicznej, całkowite stężenie białka, albumin i innych frakcji białkowych w materiale biologicznym, oznacza się zwykle immunotrubidymetrycznie lub immunonefelometrycznie z użyciem analizatorów różnych typów z zadowalającą czułością i wykrywalnością. Opisując czynniki fizyczne i chemiczne wpływające na oznaczania albuminy, Doktorant włącza do nich leki, które charakteryzuje następnie w podrozdziale 2.5 (str. 32). Leki te określa jako stosowane w leczeniu chorób nerek i wymienia je w innym porządku niż przyjął na kolejnych stronach. Wybór ten budzi

pewne zastrzeżenia, gdyż nie wszystkie związane są z leczeniem chorób nerek, lecz mają inne, bardziej celowe zastosowania. Mogą być stosowane jako leki towarzyszące u pacjentów z chorobami nerek towarzyszącymi zasadniczej chorobie, np. cukrzycy czy chorobie nowotworowej. Należy przypuszczać, że powodem ich wykorzystania w rozprawie do badania wpływu na stężenie albuminy w moczu było najczęściej ich nefrotoksyczne działanie, mogące prowadzić do przewlekłej choroby nerek (CKD, *chronic kidney disease*). Pierwszy z wymienionych leków, metformina jest lekiem przeciwhiperglikemicznym, stosowanym w leczeniu cukrzycy typu 2, a niewydolność nerek jest wręcz przeciwwskazaniem do przyjmowania tego leku. Drugi przykład to 2,4-tiazolidinedion, substancja nie zarejestrowana jako lek, a więc nie stosowana w tej formie w terapii. Związek, którego strukturę przedstawiono w rozprawie na stronie 35 jest jedynie fragmentem budowy leków stosowanych w leczeniu cukrzycy, zwiększających wrażliwość na insulinę. Ta grupa leków metabolizowana jest w wątrobie, a metabolity wydalane są z kałem i moczem. Doktorant nie podał jednak czy metabolitem pojawiającym się w moczu jest właśnie 2,4-tiazolidinedion, co uzasadniałoby jego wykorzystanie do badań. Aspiryna, zależnie od dawki, może być stosowana jako lek w sytuacjach wymienionych w rozprawie, głównie jako niesteroidowy lek przeciwzapalny, jednak przeciwwskazana jest w ciężkiej niewydolności nerek jako substancja nefrotoksyczna. Zauważono brak takiej informacji w rozprawie. Wybrane antybiotyki, ampicylina i cefuroksym, ograniczane są u chorych z niewydolnością nerek, ale wskazane w leczeniu ostrego i przewlekłego bakteryjnego zakażenia układu moczowego. Dobrze przenikają do moczu w niezmienionej postaci, stąd możliwy jest ich wpływ na białka obecne w moczu. Leki przeciwnowotworowe, cisplatyna i metotreksat, wydalane są głównie z moczem i wykazują działanie nefrotoksyczne, co obserwuje się poprzez między innymi zmniejszenie perfuzji nerkowej, uszkodzenie nabłonka cewek nerkowych, zaburzenia elektrolitowe. W rozprawie brak jednak wyjaśnienia ich nefrotoksyczności. Nefroprotecyjne działanie wykazują dwa spośród wybranych leków, kaptopril i werapamil. Kaptopril należący do grupy ACEI (inhibitory konwertazy angiotensyny I) działa nefroprotecyjnie poprzez obniżanie ciśnienia tętniczego, hamowanie białkomoczu i opóźnianie wystąpienia schyłkowej niewydolności nerek. Jego działanie jest bardzo krótkotrwałe i dlatego został zastąpiony innymi, bardziej skutecznymi lekami z grupy ACEI. Werapamil, antagonistą wapnia, jest wprawdzie lekiem nefroprotecyjnym, jednak uważanym za mniej skuteczny niż leki z grupy ACEI.

Wydaje się, że wyraźne wskazanie nefrotoksycznego lub nefroprotekcijnego działania wybranych do badań leków, oraz niektórych cech struktury jak obecność grup funkcyjnych, czy polarność, pomogłoby w analizie uzyskanych wyników.

Cel badań wraz z postawioną hipotezą umieszczony został nietypowo na początku rozprawy, przed częścią teoretyczną. Po zapoznaniu się z całością należy uznać ten zamysł za trafny, gdyż ukierunkował kolejne rozdziały rozprawy i skupił uwagę czytającego na zagadnieniach ściśle związanych z zaplanowanymi badaniami bez rozpraszania się na mniej istotne kwestie. Zastrzeżenie budzi użycie niektórych określeń, jak „...wynik analizy albuminy ludzkiej...”, które powinno brzmieć: „...zmiany stężenia albuminy w moczu...”. Drugi cel pracy wymaga również przerwania, gdyż niezależnie od tego, czy stwierdzony zostanie wpływ wybranych leków na stężenie albuminy w moczu, można podjąć próbę wyjaśnienia obserwowanego efektu lub jego braku opierając się na różnicach we właściwościach chemicznych i działaniu terapeutycznym wybranych leków i związków chemicznych.

Na szczególną uwagę w mojej opinii zasługuje Część doświadczalna, spełniająca w pełni oczekiwania wobec prac wykonywanych z wykorzystaniem licznej nowoczesnej aparatury pomiarowej i metod analitycznych. Ta część rozprawy zajmuje ponad 40 stron i jest przedstawiona bardzo wyczerpująco i merytorycznie. Wskazuje na duże doświadczenie Doktoranta w pracy laboratoryjnej, opanowanie warsztatu badawczego, umiejętność wyboru i zastosowania wielu metod analizy chemicznej. Wszystkie zastosowane procedury zostały szczegółowo udokumentowane, co świadczy o rzetelności wykonanych badań i daje możliwość wykorzystania ich przez innych badaczy. Rozdział zawiera opis metod badawczych, zwłaszcza elektroforetycznych oraz spektralnych, szczegóły metodyczne (przygotowanie odczynników i roztworów modelowych) oraz wyniki badań. Dokumentacja wyników jest w zasadzie wystarczająca, jednak ich rzetelna ocena jest utrudniona, między innymi z powodu braku opisu zastosowanych metod analizy statystycznej, nawet faktu jej przeprowadzenia. Należy przyjąć, że wyniki pomiarów, zwłaszcza uzyskanych metodą żelowej elektroforezy płytowej, przedstawione zostały jako średnie i odchylenia standardowe (powierzchnie pików i stężenia), a porównywane wartości dla albuminy bez i w obecności leku nie różnią się, gdyż nie wskazano wartości prawdopodobieństwa. Liczne stwierdzenia, w tym: „Jak widać z rysunku 25 (sam lek jest bierny elektroforetycznie) zarówno stężenie 20 mg/l jak i 40 mg/l wpływa w obu przypadkach prawie dwukrotnie na zmniejszenie pola powierzchni pików monomeru albuminy” (str. 56, ostatni akapit) są co najmniej niewłaściwe

w rozprawie doktorskiej. Zdanie to powinno brzmieć: „Jak wynika z rysunku nr 25, cisplatyna w stężeniu 20 mg/l i 40 mg/l zmniejsza pole powierzchni pików monomeru albuminy” (podać z jakim prawdopodobieństwem to stwierdzono!). Podobnie w tabeli 11, podano dane liczbowe, które nie zostały porównane żadnym testem statystycznym i nie wiadomo, czy stężenie monomeru albuminy bez oraz w obecności cisplatyny różnią się między sobą, a więc, czy cisplatyna wpływa na stężenie monomeru albuminy. Ponadto nie stwierdzono, czy dwukrotne większe stężenia cisplatyny w tym doświadczeniu wywarło większy wpływ. Z tych samych powodów stwierdzenie będące ostatnim zdaniem na stronie 64 nie jest uzasadnione z powodu braku analizy statystycznej wyników w tabeli 15. Wyjaśnienia wymaga również określenie „pozorne zmniejszenie stężenia monomeru albuminy w roztworze”. Tego rodzaju uwagi dotyczą całego podrozdziału 3.3. „Badania elektroforetyczne”.

W kolejnym podrozdziale Części doświadczalnej przedstawione zostały wyniki badań spektralnych oceniających możliwość tworzenia połączeń albuminy z poszczególnymi lekami. Stanowią bardzo ciekawą kontynuację badań elektroforetycznych wpływu leków na albuminę w moczu. Wydaje się, że wskazują jednoznacznie, zwłaszcza analiza widm w świetle UV-VIS, na oddziaływanie albumina-lek. Ważnym osiągnięciem Doktoranta jest wykazanie różnic w strukturze drugorzędowej albuminy bez i w obecności leków dzięki analizie widm w podczerwieni i pomiarom dichroizmu kołowego. Tytuł tego podrozdziału (3.4. Spektrofotometria UV-VIS) powinien być jednak zmieniony, gdyż nie przedstawia samej spektrofotometrii UV-VIS, ale konkretne wyniki badań uzyskane z jej użyciem. Inne nieuzasadnione stwierdzenia to „Śladowy wpływ...” na stronie 69 (górny akapit), „Na rysunku powyżej widać...” (strona 70, pod rysunkiem 39). Podobne kolokwialne wyrażenia są również obecne w innych częściach rozprawy.

Dyskusja wyników przeprowadzona została wnikliwie, umiejętnie wykorzystane zostały wyniki własne w odniesieniu do badań innych autorów. Doktorant słusznie zwrócił uwagę na możliwość tworzenia kompleksów wpływających na ocenę stężenia albuminy w moczu i jednocześnie na trudności napotkane w wyjaśnieniu oddziaływania wybranych leków z albuminą. Przedstawił podział badanych leków na trzy grupy zależnie od wpływu, jaki wywierały na albuminę w warunkach *in vitro*, zbliżonych wprawdzie do oznaczeń w moczu, jednak wymagających potwierdzenia w badaniach *in vivo*. W każdej z wyodrębnionych grup leków, czyli bez wpływu, o niewielkim wpływie oraz zwiększających stężenie albuminy w modelowych roztworach, znalazły się leki o różnym działaniu terapeutycznym. W tej części rozprawy znajdują się liczne nieprecyzyjne określenia,

interpunkcyjne i stylistyczne błędy, utrudniające czytanie i sugerujące brak ostatecznej korekty przed oddaniem rozprawy do recenzenta i umniejszające ocenę. Doktorant ostrożnie podsumował uzyskane wyniki, co należy uznać za słuszne, gdyż dopiero dokładniejsze badania, prowadzone *in vivo*, mogłyby potwierdzić faktyczny wpływ pojawiających się w moczu leków i ich metabolitów na wyniki analiz klinicznych, istotnych w diagnostyce i dotyczących również wpływu na inne białka obecne w płynach fizjologicznych. Wnioski końcowe odpowiadają na założone cele, jednak sformułowane zostały zbyt ogólnie, w tym pierwszy, który powinien ujmować różny wpływ leków na albuminę w moczu. Drugi wniosek wymaga przeredagowania, gdyż elektroforeza na żelu poliakrylamidowym była metodą z wyboru, została umieszczona w celu pracy i nie wymagało to komentarza we wnioskach, gdyż nie stosowano innych metod oznaczania albuminy dla porównania słuszności jej wyboru. W trzecim wniosku uzasadnione jest stwierdzenie o tworzeniu kompleksów lek-albumina w moczu, prowadzącym do zmiany konformacji białka, co zostało poparte wynikami analizy spektralnej. Druga jego część mogłaby być usunięta lub przeredagowana tak, aby wskazać skład tworzonych kompleksów albumina-lek i udział w tym barwnika CBB.

Rozprawa zawiera szeroki wykaz piśmiennictwa, obejmujący 176 publikacji, wykaz publikacji doktoranta, w tym jedną związaną z tematyką rozprawy opublikowaną w czasopiśmie z listy filadelfijskiej (IF 1,549), wykaz skrótów, zgodę Komisji Bioetycznej przy OIL w Lublinie oraz zgody wydawców dwóch czasopism naukowych na wykorzystanie w rozprawie rycin. Nie zamieszczono w rozprawie streszczeń w języku polskim i angielskim.

Z obowiązku recenzenta powinnam również zwrócić uwagę na stylistyczne niedociągnięcia, takie jak:

- liczba aminokwasów zamiast ilość aminokwasów (str. 13),
- albumina w osoczu krwi jako parametr lub wskaźnik, lecz nie marker (str. 16 i 17),
- glikowana albumina jako wskaźnik wyrównania cukrzycy, ale nie marker (str. 17),
- mikroalbuminuria jako wczesny wskaźnik nefropatii grożącej niewydolnością nerek, ale nie wczesny wskaźnik niewydolności nerek (str. 18)
- makroalbuminuria jako składowa zespołu nerczycowego, a nie stan „dysfunkcji nerek wskazujący na bardzo poważną chorobę”,
- HSA wiążąc się z lekiem zmniejsza skutecznie stężenie wolnego leku (str. 19) – należy dodać: we krwi, gdyż o wiązaniu leków przez albuminę w moczu niewiele wiadomo,

- tytuł podrozdziału na stronie 19 powinien ulec zmianie z „Analizowanie...” na „Badanie...” lub „Analiza...”,
- użycie określenia „zawartość albuminy w moczu” w wielu miejscach w rozprawie, między innymi we wnioskach końcowych, jest nieprawidłowe i powinno być zastąpione przez „stężenie albuminy...” gdyż wyrażane jest w jednostkach stężenia,
- na stronie 46 (linie 6 i 7 od dołu) i 47 (w tabeli 6) brak wyjaśnienia z jakiego powodu pojawiły się dwa leki, gentamycyna i ketoprofen, nie ujęte w grupie leków wybranych do badań, ich wpływ na albuminę nie był również oceniany w dyskusji,
- strona 52: stwierdzenie w podrozdziale „Cefuroksym”: „Antybiotyk stosowany w chorobach nerek” powinien być zmieniony na: „Antybiotyk stosowany jest w zakażeniach dróg moczowych”,
- strona 52, linia 2 od dołu: zmienić „...na oznaczanie albuminy...” na „...na stężenie albuminy...”,
- należy poprawić na stronie 53, ostatni akapit: „... monomeru albuminy z roztworu modelowego...” na „...monomeru albuminy w roztworze modelowym...” oraz podobnie w innych miejscach rozprawy,
- należy usunąć z rozprawy zwyczajowe określenie: „praktycznie nie różnią się...” i zamienić na bardziej precyzyjne i wynikające z przeprowadzonej analizy statystycznej: „nie różnią się istotnie statystycznie”, przy założeniu $p \leq 0,05$,
- wyjaśnić jaki aminokwas przedstawia skrót Are (strona 91, linia 17 od góry, strona 97, linia 8 od dołu),
- sposób przedstawiania liczb w języku polskim jest następujący: 0,75, a nie 0.75, co pojawia się w kilku miejscach w Dyskusji wyników, np. na stronie 90 i 93.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska została przygotowana poprawnie pod względem formalnym z licznymi zastrzeżeniami językowymi podanymi powyżej. Sugeruję ich korektę przed dalszym postępowaniem lub publikacją wyników w formie pracy oryginalnej.

Na podkreślenie zasługuje szeroki zakres przeprowadzonych badań, oryginalnych i nowatorskich, dający możliwość klinicznego wykorzystania wyników w diagnostyce i terapii. Problem interakcji białek i leków w moczu jest niedostatecznie zbadany i zasługuje na więcej uwagi, gdyż wydalanie leków i ich metabolitów zajmuje naukowców znacznie mniej niż ich działanie we krwi i tkankach. Należy docenić podjęcie przez Doktoranta tego

tematu, sumienność, dociekliwość i konsekwencję w prowadzeniu badań, połączone z umiejętnością wykorzystania nowoczesnego warsztatu badawczego.

Podsumowując, w mej opinii praca doktorska mgr Rafała Kuzioły pt.: **„Oddziaływanie wybranych leków na albuminę w moczu ludzkim”** spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z ustawą z dnia 14 marca 2003 roku „Ustawa o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach w zakresie sztuki” (Dz. U. nr 65, poz. 595).

Na tej podstawie stawiam wniosek do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr Rafała Kuzioły do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Poznań, 12.07.2018 r.

Chauwa Iskra

Prof. dr hab. Maria Iskra
Katedra Chemii i Biochemii Klinicznej
Uniwersytet Medyczny
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu