

Dr hab. Beata Godlewska-Żyłkiewicz, prof. UwB
Instytut Chemii
Uniwersytet w Białymstoku
ul. Hurtowa 1, 15-399 Białystok
e-mail: bgodlew@uwb.edu.pl tel. 857457821

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Moniki Kaczmarczyk

„Badanie połączeń platyny z białkami w płynach ustrojowych metodami spektrometrii atomowej i spektrometrii mas”

Metale szlachetne, w tym platyna, ze względu na unikalne właściwości, od wielu lat są szeroko wykorzystywane w różnych dziedzinach działalności ludzkiej. Jednym z niezwykle istotnych obszarów zastosowania platyny jest medycyna. Platynę wykorzystuje się do produkcji urządzeń biomedycznych stosowanych w leczeniu chorób serca (np. rozruszników serca, defibrylatorów, cewników elektrofizjologicznych, stentów) oraz mikrouządzeń neuromodulacyjnych (np. stymulatorów mózgu, implantów ślimakowych). Jednym z najnowszych zastosowań są cewki wykonane z drutu platynowego stosowane w leczeniu tętniaków. Niezwykle cenną właściwością platyny, która znalazła zastosowanie w leczeniu wielu nowotworów, jest zdolność niektórych jej kompleksów do hamowania podziału komórek żywych. Najbardziej znanymi związkami platyny wykorzystywanymi w terapii nowotworów jąder i jajników oraz coraz częściej nowotworów głowy, pęcherza moczowego i jelita grubego są: *cis*-platyna (*cis*-diaminadichloroplatyna(II)), karboplatyna (*cis*-diamina(1,1-cyklobutanodikarboksylano) platyna(II)) oraz oksaliplatyna. Związki te w organizmie ludzkim wiązane są przez białka oraz pełniące równie ważne funkcje związki drobnocząsteczkowe. Badaniami dotyczącymi identyfikacji i funkcji białek oraz metabolitów w organizmie zajmują się nowe dziedziny nauki – proteomika i metabolomika. Ich rozwój prowadzi do poznania i zrozumienia zjawisk zachodzących wewnątrz komórki, co może pozwolić w przyszłości na modelowanie nowych leków, indywidualną terapię i monitorowanie jej postępów. Badania tego typu wymagają interdyscyplinarnego podejścia, gruntownej wiedzy i zastosowania wielu komplementarnych, ultraczułych metod analitycznych. Opisane w literaturze badania połączeń leków zawierających platynę z białkami i metabolomami prowadzone są w większości w roztworach modelowych. Niewiele jest prac prowadzonych w rzeczywistych próbkach klinicznych, dlatego niezwykle ważne jest opracowanie metod i procedur analitycznych pozwalających na identyfikację i oznaczanie form chemicznych, w jakich platyna może występować w materiale klinicznym.

Rozprawa doktorska mgr Moniki Kaczmarczyk wpisuje się w nurt badań prowadzonych w tej dziedzinie na świecie. Przedłożona rozprawa liczy 170 stron i składa się z 12 rozdziałów, w tym 6 rozdziałów części literaturowej oraz 6 rozdziałów części doświadczalnej. Praca zawiera 61 rysunków i 27 tabel, zaś cytowana bibliografia obejmuje 142 pozycje. Badania, których wyniki prezentowane są w pracy doktorskiej, wykonane zostały pod kierunkiem prof. dr hab. Ewy Bulskiej w Pracowni Teoretycznych Podstaw Chemii Analitycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego.

Badania zaplanowane w rozprawie, a wymienione w tytule, wymagają dysponowania niezawodnymi, dokładnymi i czułymi procedurami oznaczania platyny i jej połączeń w próbkach klinicznych. Wiadomo, że oznaczanie całkowitej zawartości platyny w próbkach klinicznych wymaga zastosowania czułych i nie obarczonych interferencjami technik detekcji, ale śledzenie jej połączeń z białkami jest znacznie trudniejszym zadaniem analitycznym. Uzyskanie rzetelnych wyników oznaczeń może nastąpić jedynie w wyniku połączenia umiejętności właściwego przygotowania próbek klinicznych przed etapem oznaczania, zapewniającego zachowanie istniejących połączeń analitu, ze znajomością jego właściwości fizykochemicznych oraz prawidłowym wyborem techniki rozdzielania i oznaczania. Doktorantka, ze względu na niskie granice wykrywalności oraz selektywność, jako techniki oznaczania wybrała atomową spektrometrię absorpcyjną z atomizacją elektrotermiczną oraz spektrometrię mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej, zaś jako metody rozdzielania elektroforezę żelową i wysokosprawną chromatografię cieczową z wykorzystaniem kolumn wykluczania i jonowymiennych. Do identyfikacji białek mgr Kaczmarczyk zaproponowała zastosowanie tandemowej spektrometrii mas po uprzednim rozdzieleniu indywiduów na kolumnie w odwróconym układzie faz.

Część literaturowa pracy zawiera krótki opis historii odkrycia oraz przykładowych zastosowań platyny, ze szczególnym naciskiem położonym na jej wykorzystanie w lekach stosowanych w terapii przeciwnowotworowej. Opisana jest również toksyczność cisplatyny i karbolatyny na organizm ludzki. W kolejnych rozdziałach Doktorantka porusza zagadnienia związane z analizą specyficzną platyny, przedstawia informacje na temat połączeń platyny z białkami: albuminami, hemoglobina i metalotioneinami. Szerzej opisuje metody badania platyny w próbkach klinicznych, szczególnie koncentrując się na technikach stosowanych w doświadczalnej części pracy. Przedstawia również przykłady wykorzystania opisywanych technik w badaniach oddziaływania związków platyny z białkami i rozdzielania form cisplatyny. Dobór treści w tej części pracy jest właściwy, jednak brakuje w niej podsumowania, w którym Doktorantka, po przedstawieniu stanu wiedzy w tym obszarze, pokazuje nierozwiązane problemy i uzasadnia podjęcie badań.

Prezentację wyników badań własnych Doktorantka rozpoczyna od opisu metodyki przygotowania do badań próbek klinicznych: surowicy krwi i moczu pacjentów poddawanych chemoterapii. Kolejny rozdział (numer 10) jest w zasadzie przygotowaniem metodycznym do oznaczania platyny w matrycy

biologicznej technikami GFAAS i ICP-MS. Doktorantka we wstępie do rozdziału zaznacza, że obie stosowane techniki pomiarowe zostały zoptymalizowane, zwalidowane i zbadano wpływ interferentów na oznaczanie platyny. Zasadniczo badania zaplanowano prawidłowo, ale do tego rozdziału mam najwięcej uwag krytycznych. W przypadku obu technik nie podano w jaki sposób wyznaczano granice wykrywalności i oznaczalności platyny. Jako przygotowanie próbek klinicznych do oznaczania platyny proponowane jest ich rozcieńczenie 1% HNO_3 z dodatkiem Tritonu X-100, a trzeba mieć na uwadze, że dodatek taki zmieni równowagi w próbkach i może spowodować uwolnienie platyny z połączeń z białkami, również tymi które powstały podczas inkubacji próbek surowicy lub moczu z platyną (ciekawe, czy badania takie były prowadzone przez Doktorantkę lub są opisane w literaturze). Doktorantka zaznacza (str. 51), że niedostępne są certyfikowane materiały odniesienia dla próbek klinicznych. Obecnie dostępne są CRM z certyfikowaną zawartością Pt (np. NIST-2670A i SERO201205 dla moczu, SERO201405 dla surowicy, SERO210105 dla krwi) oraz kontrolny materiał surowicy krwi z podanymi zawartościami pierwiastków śladowych, w tym platyny (na poziomie ng/L) np. ClinChek® - Control Plasma Control lyophilised 8883, który można zastosować do wewnątrzlaboratoryjnego zapewnienia jakości.

Technika GFAAS: Optymalizację programu wzrostu temperatur w kuwecie grafitowej w cyklu analitycznym doktorantka prowadziła dla próbki wzorcowej surowicy krwi – zabrakło jednak wyjaśnienia co oznacza ten termin- czy jest to mieszanina głównych białek surowicy z dodatkiem platyny, czy też jest to uśredniona próbka surowicy pobranej np. od wielu pacjentów. Wprawdzie na stronie 59 pojawia się wyjaśnienie, że wzorcowa surowica krwi pochodziła od zdrowego ochotnika, ale kolejną wątpliwość budzi wyjaśnienie, że platynę dodawano w postaci PtCl_2 , związku nierozpuszczalnego w wodzie (str 59, 76, 100). Zaskoczona jestem niską czułością oznaczeń platyny techniką GFAAS - szczególnie, że korzystano z pomiaru absorbancji maksymalnej (w moich badaniach w standardowych warunkach czułość jest niemal 10-krotnie wyższa), oraz tak szerokim zakresem prostoliniowości wykresów wzorcowych - w zakresie 2 rzędów wielkości (od 11 do 1000 $\mu\text{g/L}$). Nie jest jasne, czy wpływ rozpuszczalnika na oznaczanie platyny badano dla wodnych roztworów wzorcowych czy roztworów zawierających surowicę krwi (bardziej poprawnie), i w jaki sposób (dla jakich roztworów) wyznaczona jest np. granica oznaczalności. Wiadomo, że granice oznaczalności uzyskiwane dla prostych roztworów wzorcowych (tzw. granice instrumentalne) są zwykle wielokrotnie niższe niż dla próbek rzeczywistych, zawierających złożoną matrycę. Podrozdział ze str. 60 doktorantka zatytułowała „Badanie precyzji i dokładności wykonywanych pomiarów”, ale wyniki zamieszczone w tabeli 6 pozwalają jedynie na oszacowanie precyzji pomiarów.

Ciekawe są badania dotyczące otoczenia spektralnego linii rezonansowej platyny prowadzone techniką HR CS FAAS, jednak ich wyniku można było się spodziewać analizując linie spektralne wybranych do

badania interferentów. Jedynie linia spektralna glinu (265,248 nm) znajduje się w pobliżu linii platyny (265,945 nm), jednak odległość między nimi (0,697 nm) jest zbyt duża, aby można ją było zaobserwować na wysokorozdzielczym widmie platyny rejestrowanym w zakresie od 265,7980 do 266,0905 nm. Niepokoi fakt, że ocena wpływu interferentów na sygnał analityczny platyny przeprowadzona została w oparciu o absorbancje rejestrowanych roztworów o wartościach poniżej 0,005 j.a., co z pewnością wpływa na precyzję i dokładność pomiarów. Uważam, że ten fragment pracy - badania przeprowadzone tylko w wodnych roztworach modelowych - nie ma bezpośredniego związku z tematem prezentowanej rozprawy. Istotne dla rozprawy byłyby obserwacje prowadzone dla próbek surowicy i moczu, które zawierają w swojej matrycy znacznie więcej potencjalnych interferentów.

Technika ICP-MS: Opis elementów spektrometru przedstawiony na stronach 69-70 powinien znaleźć się w części literaturowej w rozdziale poświęconym technice ICP-MS. W celu zapewnienia właściwej pracy spektrometru analityk powinien każdego dnia pomiarowego wykonywać pewne standardowe czynności, m.in. sprawdzenie czułości dla oznaczanych pierwiastków i ustalenie takich parametrów, aby uzyskiwać minimalne intensywności sygnałów od tlenków i jonów podwójnie naładowanych. W tym kontekście zbędne jest zamieszczenie w pracy tabeli 7. Dane zamieszczone w tabeli 9 znajdują się już w części literaturowej (str. 29). Celem zastosowania wzorca wewnętrznego jest uwzględnienie podczas pomiarów efektywności transportu próbki do plazmy oraz efektywności detekcji. Prawidłową korekcję zapewnia użycie wzorca o masie atomowej zbliżonej do masy oznaczanego analitu oraz zbliżonej energii jonizacji. Z tego punktu widzenia wybór rodu (^{103}Rh) jako wzorca wewnętrznego do oznaczania platyny techniki ICP-MS nie jest najlepszy, gdyż liczby masowe obu pierwiastków różnią się prawie dwukrotnie (^{195}Pt). Uzasadnienie wyboru tego wzorca znaleźć można dopiero w rozdziale 11.2.

Komentarz pod Tabelą 13 nie jest poprawny z punktu widzenia metrologii chemicznej.

W rozdziale 11 mgr Monika Kaczmarczyk opisuje badania dotyczące właściwego tematu rozprawy doktorskiej. Doktorantka rozpoczyna pracę od zoptymalizowania procesu rozdzielania białek techniką elektroforezy żelowej na żelu poliakrylamidowym, następnie optymalizuje procedurę oznaczania Pt w żelu techniką ICP-MS połączoną z ablacją laserową (LA). Zaproponowana technika analityczna pozwala na uzyskanie informacji o rozmieszczeniu platyny w rozdzielonych na żelu białkach. Warto podkreślić, że technika LA-ICP-MS jest mało rozpowszechniona w analizie próbek biologicznych, przede wszystkim ze względu na trudności związane z wzorcowaniem. Brak komercyjnie dostępnych wzorców zwykle ogranicza jej wykorzystanie do określenia względnych różnic pomiędzy zawartością pierwiastków w różnych obszarach badanych tkanek (metoda półilościowa). Doktorantka zaproponowała rozwiązanie polegające na przygotowaniu własnych wzorców z żelu wzbogaconego w analit oraz wzorzec wewnętrzny – rod. W ten sposób uzyskała wykres kalibracyjny, na podstawie którego wyznaczyła zawartość platyny we frakcjach białek rozdzielonych na żelu. Zastosowanie „małej”

komory ablacyjnej pozwoliło na podniesienie czułości, precyzji oraz szybkości oznaczeń w porównaniu z danymi literaturowymi [odn. 55 i 125]. Badania mgr Kaczmarczyk pozwoliły na zobrazowanie zawartości Pt w białkach po ich elektroforetycznym rozdzielaniu i potwierdzenie, że Pt w surowicy związana jest głównie z albuminami i transferyną. Wykorzystanie złoża Multiple Affinity Removal Spin, na którym oddzielone zostały główne białka surowicy (albuminy, transferyny, globuliny), pozwoliło Doktorantce na stwierdzenie, że cisplatyna i karboplatyna wiązane są również przez inne białka obecne w surowicy krwi. Eksperymenty takie warto kontynuować. Badania dotyczące elektroforetycznego rozdzielania białek i oznaczania Pt techniką LA-ICP-MS zostały logicznie zaplanowane, starannie wykonane i opisane. Uwagi mam jedynie do komentarza pod rysunkiem 30 (str. 110), w którym mgr Kaczmarczyk pisze, że „zgodnie z przewidywaniami nie zarejestrowano wzrostu sygnału platyny na całej długości paska”. W opublikowanych pracach [odn. 119] opisano efekt zanieczyszczenia platyną żeli elektroforetycznych, o czym Doktorantka wspomina zresztą na str. 37. Proszę również o wyjaśnienie, jakie stężenia siarczanu (VI) dodecylu sodu (SDS) badano w pracy, gdyż z danych literaturowych [odn. 117] wynika, że 1% stężenie SDS nie powoduje rozerwania połączenia białko-Pt.

W dalszej części pracy mgr Kaczmarczyk do rozdzielania białek surowicy proponuje, niestety bez powodzenia, zastosowanie wysokosprawnej chromatografii wykluczania. Zastosowanie tej techniki pozwoliło jednak Doktorantce na oddzielenie związków zawierających platynę (cisplatyna) związanych z białkami od form niezwiązanych i ich ilościowe oznaczenie w surowicy pacjentów po chemioterapii. Wydaje się, że różnica pomiędzy zawartością Pt w surowicy oznaczoną techniką SEC-HPLC ICP-MS i bezpośrednio techniką ICP-MS może być spowodowana również pozostaniem części związków zawierających platynę na kolumnie. Czy badania takie były prowadzone w pracy?

Chromatografię jonowymienną Doktorantka zastosowała do badania reakcji hydrolizy cisplatyny i karboplatyny w roztworach wodnych, roztworach zawierających jony chlorkowe oraz w moczu. Opracowana procedura rozdzielania, ze względu na różnicę w czasach retencji obu leków, pozwoliła również na ocenę, którym związkiem leczenia byli pacjenci i ilościowe oznaczenie platyny w badanych próbkach. W ostatnim rozdziale rozprawy Doktorantka za pomocą tandemowej spektrometrii mas potwierdziła swoje wcześniejsze obserwacje, że w surowicy krwi cisplatyna i karboplatyna łączą się ze związkami o małych masach cząsteczkowych (2000-4200Da), prawdopodobnie peptydami.

Ocena redakcyjnej strony pracy :

Odbiór pracy utrudnia wiele błędów składniowych i literowych (z wyjątkiem rozdziału 11). Docenić jednak należy starannie przygotowane rysunki. W pracy występują również pewne potknięcia terminologiczne. Poniżej przedstawiam wybrane przykłady niezręcznych lub błędnych sformułowań użytych w pracy oraz zauważonych błędów i omyłek Doktorantki.

Nr strony pracy	Jest	Powinno być
22	woltamperometria absorpcyjna	woltamperometria adsorpcyjna
25	Stosuje się różnego rodzaju detektory, np. spektrofotometrię UV-VIS, ...	
27, 53	efekt Zemana	efekt Zeemana
29	Interferencje izobaryczne należą do grupy interferencji spektralnych, które są wynikiem powstawania jonów izobarycznych, podwójnie naładowanych i wieloatomowych i niskiej rozdzielczości spektrometru. Błędnie podany jest jeden z jonów izobarycznych powodujących interferencje podczas oznaczania Pt techniką ICP-MS, mianowicie $^{194}\text{YbO}^+$	
29,32,136, 137, 138	monowodna cisplatyna, forma jednowodniona, dwuwodnacycisplatyna	zhydrolizowana cisplatyna, akwakompleks cisplatyny: cis-diaminaakwachloroplatyna (II) cis-diaminadiakwacycisplatyna(II)
42	skimmer	zgarniacz
61	niewłaściwy odnośnik literaturowy	
72	Mainhardta	Meinharda
72	stężenie Rh 10 g/L	10 µg/L
82	brak opisu kolumn w tabeli 16	
84,85	N',N'-metyleno-bis-akrylamid	N',N'-metyleno-bis-akrylamid
85	wybarwiania	odbarwiania
86	transferyna	transferyna
99	warunki aparaturowe	warunki pomiarowe
115	rys 28	rys 29
121,122	chromatografia wykluczenia	chromatografia wykluczania
100,101,123, 129,130	współczynnik korelacji	współczynnik determinacji
136	20 s	230 s
146	Elektrosprej	elektrozpraszanie
146	Opis techniki ESI znajduje się już na str. 41-42 (część literaturowa)	
160-170	Niejednolity sposób cytowania literatury: pełne nazwy czasopism oraz skróty, małe i duże litery w tytułach angielskich, brak wydawcy przy niektórych pozycjach, w odn. 59 brak tytułu czasopisma i wolumenu,	

Wymienione uwagi dotyczące strony redakcyjnej nie wpływają na pozytywną ocenę merytorycznej części pracy. Mgr Monika Kaczmarczyk Doktorantka postawiła sobie w pracy ambitne cele – „opracowanie scenariusza badania połączeń platyny z białkami surowicy krwi oraz podjęcie próby odpowiedzi na pytanie jakie białka biorą udział w leczeniu chorób nowotworowych i transporcie leków platyny”. Pierwszy z założonych celów jest konsekwentnie realizowany w kolejnych etapach pracy badawczej. Natomiast drugi cel nie został sformułowany poprawnie, gdyż w części literaturowej Doktorantka wyjaśniając mechanizm działania leków platynowych (str. 14) stwierdza, że „frakcja leku związana z białkiem nie wykazuje aktywności przeciwnowotworowej”. Po zapoznaniu się z rozprawą

uważam, że bardziej poprawne sformułowanie celu powinno brzmieć „zbadanie oddziaływania leków zawierających platynę z białkami płynów ustrojowych”.

Zaproponowane w pracy procedury analityczne stanowią oryginalne rozwiązanie problemów naukowych, a także wykazują umiejętność prowadzenia pracy naukowej. W trakcie wykonywania pracy Doktorantka prowadziła badania na kilku rodzajach spektrometrów (GFAAS, HR CS FAAS oraz ICP-MS) sprzęgając tę aparaturę z technikami chromatograficznymi, elektroforezą żelową oraz systemem ablacji laserowej. Jestem przekonana, że mgr Monika Kaczmarczyk jest obecnie specjalistką w posługiwaniu się tymi technikami.

Podsumowując moją ocenę rozprawy doktorskiej mgr Moniki Kaczmarczyk stwierdzam, że recenzowana rozprawa spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim określone w art.13 *Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 r.* i wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie pani mgr Moniki Kaczmarczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Branyś, 9.03.2012

B. Górecka-Tytkiewicz