



Recenzja rozprawy doktorskiej
Mgr Moniki Kaczmarczyk
Pt. Badanie połączeń platyny z białkami w płynach ustrojowych metodami
spektrometrii atomowej i spektrometrii mas

Pani mgr Monika Kaczmarczyk wykonała pracę doktorską pod kierunkiem prof. Ewy Bulskiej w Pracowni Teoretycznych Podstaw Chemii Analitycznej. Tematyka pracy dotyczy opracowania procedur analitycznych pozwalających na oznaczenie platyny w różnych formach występujących w płynach fizjologicznych. Tematyka jest niezwykle aktualna z dwóch powodów. Jednym z nich jest dostawanie się do organizmu platyny ze środowiska w wyniku używania katalizatorów spalin samochodowych, drugim – stosowanie związków platyny w terapii wielu nowotworów. Pani mgr Monika Kaczmarczyk skupiła się na drugim źródle związków platyny w organizmie ludzkim. Badania dotyczą surowicy krwi, do której podawane są związki platyny podczas chemioterapii oraz moczu, z którym są wydalane z organizmu. Poznanie specjacji platyny w obu płynach fizjologicznych w istotny sposób wzbogaca naszą wiedzę na temat losów stosowanych farmaceutyków w organizmie ludzkim. Obserwowane farmaceutyki w ocenianej pracy to cis-platyna i karboplatyna. Ponieważ badania dotyczyły płynów fizjologicznych, konieczna była zgoda Komisji Bioetycznej. Doktorantka taką zgodę uzyskała w marcu 2008 roku.

Ocena strony technicznej i edytorskiej pracy.

Praca została przedstawiona na 170 stronach. Podzielona jest na wstęp – przybliżający tematykę badań, jej tło medyczne i określający założone cele pracy, część literaturową (rozdziały 1 – 6) - omawiającą aktualny stan wiedzy ściśle związanej z założonymi celami, cel pracy określający klarownie strategię badań (rozdział 7), część eksperymentalną (rozdziały 8 – 12) - omawiającą jasno i poglądowo a jednocześnie wyczerpująco i dogłębnie stosowane metody badawcze, zawierającą wyniki badań eksperymentalnych i ich

wszechstronną dyskusję. Zamieszczony jest spis cytowanej literatury, 142 pozycje. Spis tabel (27) i rysunków (61) ułatwia powrót do wybranych zagadnień. Rysunki i tabele dobrze systematyzują i wyjaśniają omawiane zagadnienia.

Odnośniki literaturowe są starannie dobrane. Są odpowiednio cytowane i wystarczające.

Brakowało mi spisu skrótów oraz symboli używanych w pracy, co ułatwiłoby jej czytanie.

Praca jest bardzo starannie przygotowana pod względem edytorskim. Na uwagę zasługuje estetycznie wyróżnione podsumowanie najważniejszych osiągnięć zamieszczone pod każdym rozdziałem w części eksperymentalnej. Zdarzają się jednak dość częste błędy tzw. literówki, nie jest jednak łatwo je wszystkie wyłapać podczas wielokrotnego czytania tekstu, co z pewnością było udziałem Doktorantki.

Ocena merytoryczna pracy.

Próbki biologiczne charakteryzują się bogatą matrycą, czyli zawartością wielu różnych związków chemicznych poza oznaczanym analitem. Wymaga to starannego opracowania procedur analitycznych najpierw dla układów modelowych, prostszych, a następnie dla próbek naturalnych dla wszystkich stosowanych technik analitycznych. Ważna jest dyskusja i sprawdzenie możliwych interferencji i staranne opracowanie statystyczne otrzymanych wyników. Praca jest żmudna i czasochłonna, ale konieczna dla wiarygodności wyników. Wszystkie te aspekty były starannie brane pod uwagę przez Doktorantkę i opracowywane procedury były optymalizowane pod kątem różnych parametrów.

Ważne jest przemyślenie, jakie próbki są ważne dla osiągnięcia zamierzonego celu. Jaki układ modelowy będzie najwłaściwszy. Jaki czas będzie właściwy do pobrania naturalnej próbki po podaniu leku. W przypadku krwi – czy jest stosowany środek zapobiegający krzepnięciu lub tworzony skrzep, w przypadku moczu – czy wystarczy jednorazowa dawka moczu rannego, czy wymagana jest dobowy zbiórka moczu. Doktorantka zdawała sobie sprawę z wagi tego problemu. Krew była pobierana po 24 godzinach od podania leku, do próbek próżniowych z granulatem do szybkiego wykrzepiania i oddzielania surowicy. Czyli próbka była pozbawiona białka fibrynogenu biorącego udział w skrzepie, ale za to nie zawierała sztucznie wprowadzonego antykoagulantu, który mógł

kompleksować platynę i zmieniać obraz specjacji. Mocz był pobierany również po 24 godzinach od podania leku w przypadku karboplatyny, która jest szybciej usuwana z organizmu i po 48 godzinach w przypadku cisplatyny. Naturalne próbki były odpowiednio przechowywane – w temperaturze – 20°C w dłuższym okresie i w temperaturze -4°C przez kilka dni.

Oznaczane było całkowite stężenie platyny w próbkach oraz stężenie platyny w białkach - po rozdzieleniu próbek za pomocą techniki wysokosprawnej chromatografii cieczerwowej, HPLC lub techniki elektroforezy żelowej . Technikami stosowanymi do oznaczenia platyny były atomowa spektrometria absorpcyjna z piecem grafitowym (GF AAS) oraz spektrometria mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ICP MS). Na uwagę zasługują stosowana technika mikropróbkiowania laserowego połączonego z ICP MS (LA ICP MS) żeli poliakrylamidowych oraz zastosowanie złoża Multiple Affinity Removal Spin Cartridges (MARS). Złoże MARS umożliwiło usunięcie z surowicy krwi głównych białek (albuminy, globulin, transferyny) i wykazanie, że białka śladowe również wiążą niewielkie ilości cis-platyny i karboplatyny. Brak odpowiednich wzorców uniemożliwił identyfikację połączeń.

Do rozdzielenia białek stosowano wysokosprawną chromatografię wykluczenia i wysokosprawną chromatografię jonowymienną. Porównane zostały stosowane techniki rozdzielenia.

W pracy zastosowano tandemową spektrometrię mas do identyfikacji połączeń platyny z białkami. Technika ta pozwala na uzyskanie szczegółowych informacji o badanej cząsteczce dzięki możliwości jej fragmentacji. Znalaziono wiele profili izotopowych, które prawdopodobnie pochodzą od peptydów połączonych z platyną. Prace te będą kontynuowane.

W badanych próbkach moczu stwierdzono występowanie cis-platyny i karboplatyny w ich niezmiennych postaciach, nie znaleziono sygnałów od innych form. Stanowi to istotną informację.

Podsumowując stwierdzam, że praca jest wykonana bardzo starannie, stosowano wiele współczesnych, zaawansowanych technik analitycznych i pomiarowych, których wyniki porównano ze sobą. Praca zawiera bogaty materiał doświadczalny o istotnych elementach nowości naukowej.

Podczas czytania pracy nasunęło mi się kilka pytań i uwag do Doktorantki:

Str. 76 i następne – Do wzorcowej surowicy krwi dodawano PtCl_2 w celu badania precyzji, dokładności i odzysku dodanej platyny. Czy nie lepiej byłoby dodawać podawane w terapii związki platyny?

Str. 82 – Tytuł tabeli 16 nie wyjaśnia, co zawiera tabela. Można się tego dowiedzieć z tekstu, ale tytuł powinien zawierać pełną informację.

Str. 119 – błędnie umieszczono hemoglobinę jako białko występujące w surowicy krwi.

Str. 121 – W tabeli 20 jako faza ruchoma podane jest „50 mM octan sodu pH =7 oraz woda (1:1)”. pH takiego roztworu nie jest 7.

W badanych próbkach moczu stwierdzono występowanie cis-platyny i karboplatyny w ich niezmiennych postaciach. Jak ta informacja wpływa na naszą wiedzę o oddziaływaniach obu farmaceutyków w naszym organizmie.

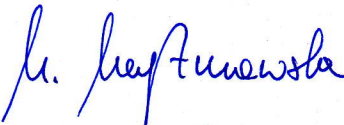
W przypadku badania dobowej zbiórki moczu można by się pokusić o oszacowanie bilansu wprowadzonej do organizmu platyny. Może wtedy też znalazłyby się metabolity różne od wprowadzanego leku.

Ciekawe byłoby sprawdzenie zawartości platyny w erytrocytach. Mogłoby to dać pogląd jaka część wprowadzonej platyny przedostaje się do wnętrza komórek.

Moje uwagi mają charakter dyskusyjny i w żadnym stopniu nie umniejszają wysokiej oceny pracy. Wyniki badań Doktorantki mają duże znaczenie poznawcze.

Reasumując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Moniki Kaczmarczyk spełnia wymagania formalne stawiane pracom doktorskim, określone ustawą o tytule i stopniach naukowych i wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa, 7.03.2012r


Magdalena Maj-Żurawska