

Dr hab. Małgorzata Iciek
Katedra Biochemii Lekarskiej
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
ul. Kopernika 7
30-034 Kraków
tel: +48 12 422 74 00 wew.32
e-mail: malgorzata.iciek@uj.edu.pl

Kraków, 12.06.2025r.



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Kurpet
zatytułowanej „Wykorzystanie chromatografii cieczowej do oznaczania
niskocząsteczkowych związków tiolowych oraz białek obecnych
w osoczu w wybranych stanach patofizjologicznych”**

Wydział Lekarski

Katedra

Biochemii Lekarskiej

Ocena ogólna

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Kurpet została przygotowana w Katedrze Chemii Środowiska Wydział Chemii Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem dr hab. Grażyny Chwatko, prof. UŁ. Doktorantka opracowała i zwalidowała trzy niezależne metody analityczne oparte na wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), które umożliwiają ilościowe oznaczanie wybranych białek oraz niskocząsteczkowych związków tiolowych w próbkach biologicznych, czyli w ludzkim osoczu i w pełnej krwi w kontekście wybranych stanów patofizjologicznych. Dwie z opracowanych metod wykorzystują detekcję fluorescencyjną z zastosowaniem przedkolumnowej modyfikacji chemicznej analitów monobromobimananem (mBBR) lub 4-aminosulfonylo-7-fluoro-2,1,3-benzoksadiazolem (ABD-F), natomiast metoda służąca do oznaczania wybranych białek w płynach ustrojowych człowieka jest oparta na detekcji rozproszenia światła przez odparowanie.

Nowatorski charakter badań Autorki jest związany z podejściem interdyscyplinarnym łączącym zaawansowane zagadnienia z zakresu chemii analitycznej, biochemii oraz medycyny. Jak wykazały przeprowadzone testy, metody opracowane przez Autorkę cechuje wysoka czułość, precyzja i ekologiczność. Na szczególną uwagę zasługuje wdrożenie zasad zielonej chemii, zwłaszcza minimalizacja objętości próbki oraz minimalizacja lub całkowite wyeliminowanie toksycznych rozpuszczalników na etapie przygotowania próbki,

ul. Kopernika 7

PL 31-034 Kraków

tel./fax +48 12 422 32 72

+48 12 422 74 00

+48 12 424 72 29

kbl_sekr@cm-uj.krakow.pl

www.biochemia.cm-uj.krakow.pl

co umożliwiło redukcję powstających odpadów chemicznych. Opracowane metody dzięki prostocie przygotowania próbek do analizy pozwalają również na niewielkie zużycie energii, co także wpisuje się w zasady zielonej chemii.

Struktura i organizacja pracy

Oceniana rozprawa doktorska ma formę monografii naukowej, obejmuje 242 strony i ma typowy układ edytorski. W rozdziale pierwszym, który stanowi wprowadzenie literaturowe Doktorantka scharakteryzowała właściwości biochemiczne i znaczenie kliniczne związków tiolowych oraz omówiła wybrane białka osocza i ich rolę w chorobach przewlekłych, a następnie wprowadziła czytelnika w zagadnienia związane z reumatoidalnym zapaleniem stawów (RZS) oraz z chorobą COVID-19 wywołaną przez wirus SARS-CoV-2. W drugim rozdziale Autorka uzasadniła motywy podjętego problemu badawczego i zdefiniowała cel pracy, którym było stworzenie zaawansowanych metod analitycznych służących do ilościowego oznaczania metabolicznie spokrewnionych związków siarki oraz wybranych białek osocza. W ramach realizacji tego celu, zamiarem Doktorantki było także zoptymalizowanie procedur przygotowania próbek krwi i osocza oraz porównanie wyników otrzymanych dla badanych grup tj. pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów oraz pacjentów ozdowieńców po zakażeniu wirusem SARS-CoV-2 z wynikami osób zdrowych.

W kolejnych trzech rozdziałach rozprawy doktorskiej Autorka szczegółowo opisała opracowane metody analityczne, czyli kolejno: oznaczanie niskocząsteczkowych tioli osocza obok albuminy surowicy ludzkiej metodą HPLC z zastosowaniem przedkolumnowej modyfikacji chemicznej analitów monobromobimaniem, oznaczanie wybranych białek metodą HPLC z detekcją rozproszenia światła przez odparowanie oraz oznaczanie różnych form redoksowych tioli techniką HPLC z zastosowaniem przedkolumnowej modyfikacji chemicznej analitów związkiem ABD-F. W każdym z tych rozdziałów poświęconych konkretnej metodzie opisane zostały zastosowane odczynniki i aparatura, warunki rozdziału chromatograficznego i badany materiał. Ponadto omówiono zastosowanie opracowanej procedury do analizy próbek pochodzących od pacjentów lub zdrowych ochotników, przeprowadzono analizę statystyczną, a następnie przedstawiono wyniki i je przedyskutowano. Rozdziały 4 i 5 uzupełniono także o ocenę ekologiczności etapu przygotowania próbki oraz o ocenę zieloności opracowanej metody chromatograficznej wykorzystując odpowiednio oprogramowanie AGREEprep oraz AGREE – Analytical GREENes Calculator.

Zasadniczą część pracy kończy rozdział zawierający podsumowanie i wnioski końcowe oraz bogaty spis bibliografii. W końcowej części rozprawy Doktorantka zamieściła także swój dorobek naukowy obejmujący publikacje naukowe, komunikaty konferencyjne, działalność dydaktyczną,

nagrody oraz udział w projektach i szkoleniach. Dorobek publikacyjny, konferencyjny oraz bogata aktywność organizacyjna działalność samorządowa, a także zaangażowanie w popularyzację nauki, a nawet działalność recenzencka wskazują na duże zaangażowanie i dojrzałość naukową Doktorantki.

Ocena merytoryczna

Doktorantka postawiła sobie za cel opracowanie trzech różnych metod analitycznych opartych na technice HPLC służących oznaczaniu różnych związków tiolowych występujących w osoczu oraz białek osocza w próbkach biologicznych pochodzących od zdrowych osób kontrolnych lub pacjentów Kliniki Reumatologii Szpitala Klinicznego w Łodzi oraz Zakładu Medycyny Rodzinnej Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi. Dysertacja powstała jako efekt współpracy z jednostkami medycznymi, wymagała Zgody Komisji Bioetycznej oraz doskonałej organizacji logistycznej związanej ze sprawnym przygotowaniem i transportem próbek. Współpraca z jednostkami medycznymi stanowi również duży atut pod względem translacyjności wyników. Oceniana rozprawa doktorska została częściowo zrealizowana w ramach projektu „Badania wpływu zakażenia koronawirusem SARS-CoV-2 oraz szczepienia przeciwko COVID-19 na układ sercowo-naczyniowy” w ramach projektów IDUB, którego Doktorantka była kierownikiem, co świadczy o jej wysokim poziomie zaangażowania i niezależności naukowej.

Zastosowane metody chromatograficzne zostały rzetelnie opracowane i bardzo szczegółowo opisane w pracy doktorskiej. Opracowane procedury były poddane walidacji zgodnie z wytycznymi Międzynarodowej Rady Harmonizacji Wymagań Technicznych dla Rejestracji Produktów Leczniczych Stosowanych u Ludzi dotyczącymi walidacji metod bioanalitycznych i analizy próbek badawczych. Oceniona została selektywność, wyznaczono zakres liniowości, granice wykrywalności i oznaczalności, a następnie oceniono precyzję, dokładność, występowanie zjawiska przeniesienia próbki, wpływ matrycy oraz zbadano stabilność analitów w matrycy. Opracowanie trzech różnych metod analitycznych oraz przeprowadzenie ich walidacji wymagało od Doktorantki ogromu pracy eksperymentalnej.

Dużą zaletą jest także zastosowanie opracowanych metod do rzeczywistych próbek biologicznych oraz próba ich praktycznego wykorzystania w diagnostyce chorób sercowo-naczyniowych, reumatycznych i powikłań po infekcji SARS-CoV-2. Opracowane metody mogą być wykorzystane w diagnostyce laboratoryjnej co pozwoliłoby na szeroką ocenę funkcji układu sercowo-naczyniowego obejmującego zarówno wybrane białka osocza, w tym białka ostrej fazy, jak i związki tiolowe, w tym w szczególności poziom homocysteiny w aspekcie chorób sercowo-naczyniowych.

Praca doktorska mgr Katarzyny Kurpet została napisana niezwykle starannie i poprawnie pod względem stylistycznym, co jest warte podkreślenia zwłaszcza biorąc pod uwagę obszerność rozprawy. Obowiązkiem recenzenta jest nie tylko podkreślenie osiągnięć Doktoranta, lecz także wskazanie pewnych niedociągnięć ocenianej rozprawy doktorskiej. Najwięcej uwag lub sugestii mam do części dotyczącej wprowadzenia literaturowego, natomiast części dotyczące opracowanych metod, czyli rozdziały 3-5 w mojej opinii są przedstawione bardzo starannie. Niewątpliwie dużą zaletą ocenianej rozprawy doktorskiej jest duża skrupulatność i staranność opisów metod i wyników. Niemniej jednak mam wrażenie, że stopień szczegółowości i skrupulatności opisów czasami jest przesadny jak na rozprawę doktorską. Mam tu na myśli np. opisy przygotowania stosowanych roztworów standardowych. W zupełności wystarczyłoby podanie stężenia stosowanego standardu tiolowego i informacja o rozpuszczalnikach. Doktorantka natomiast w przypadku każdego roztworu oprócz podania stężenia dokładnie opisała sposób przygotowania np. „Roztwór podstawowy GSSG o stężeniu 0,01 mol/l przygotowano odważając do próbówki typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml 6,1263 mg GSSG i rozpuszczając go w 100 µl 1 mol/l HCl, a następnie uzupełniając wodą destylowaną do 1 ml”, co w moim odczuciu jest zbędne i niepotrzebnie zwiększa objętość pracy.

Na stronie 22 przy omawianiu potranslacyjnych modyfikacji grup SH można byłoby wspomnieć również o persulfidacji, czyli modyfikacji grup -SH do formy wodoronadsiarczku. Na stronie 23 Autorka pisze o NAC, potem wspomina o kaptoprilu i różnych innych lekach tiolowych, potem znowu o NAC, potem ponownie o innych lekach, a następnie kontynuuje słowami „Badano również NAC pod kątem...”. W tym fragmencie pracy jest trochę chaosu, brak tu uporządkowania. Ponadto Autorka formułuje zdanie „Badano NAC pod kątem jej potencjału zapobiegania progresji raka poprzez redukcję uszkodzeń oksydacyjnych DNA i zwiększenie skuteczności chemioterapii” i cytuje odpowiednią literaturę. Samo sformułowanie jest poprawne, ale nie mówi nic na temat uzyskanych wyników i czytelnik nie wie jaki był wniosek z tego badania. Podobne cytacje pojawiają się jeszcze w kilku miejscach.

Doktorantka używa określenia transulfurylacja, podczas gdy właściwe jest raczej słowo transulfuracja, czyli przeniesienie atomu siarki. Na stronie 25 Autorka pisze, że cysteina powstaje w reakcji transsulfuracji siarki z metioniny na serynę – to sformułowanie jest trochę niefortunne, ponieważ sugeruje, że atom siarki jest przeniesiony bezpośrednio z Met na Ser, podczas gdy Met jest przekształcana do Hcy i dopiero wtedy dochodzi do przekazania atomu siarki (utworzenia cystationiny i rozszczepienia). W innym miejscu Autorka słusznie podaje, że Hcy może być przekształcona w Cys.

W mojej opinii we wprowadzeniu lepiej byłoby najpierw omówić szczegółowo wszystkie tiole (Cys, NAC, Hcy, GSH), a potem ich znaczenie pod kątem potencjalnego zastosowania

w leczeniu niektórych chorób lub jako markery w stanach patologicznych. Pozwoliłoby to uniknąć licznych powtórzeń podobnych treści. Dla przykładu na str. 26 są powtórzone informacje o zastosowaniu NAC w chorobach układu oddechowego (np. POCh, czy mukowiscydozie), jako prekursora Cys i GSH w zatruciu paracetamolem. Podobnie informacja o badaniach NAC w kierunku choroby Alzheimera, czy Parkinsona jest powtórzona parokrotnie w różnych miejscach wprowadzenia literaturowego. Przy omawianiu praktycznie każdego z tioli pojawia się podobna informacja: „odgrywa rolę w ochronie komórek przed stresem oksydacyjnym oraz w zapobieganiu chorobom neurodegeneracyjnym, takim jak choroba Parkinsona i Alzheimera” - myślę, że te informacje można było ogólnie podsumować w aspekcie omawianych tioli, bez konieczności powtarzania przy okazji każdego z nich. Mam również zastrzeżenia w stosunku do zdania: „Źródłem tego aminokwasu (mowa o NAC) w diecie są produkty bogate w Cys, takie jak jaja, mięso i nabiał, choć sama NAC nie występuje naturalnie w żywności”. To zdanie, jak zauważa sama Autorka, dotyczy cysteiny, natomiast NAC nie występuje bezpośrednio w żywności, tylko może być dostarczana w postaci leku lub suplementu.

Opisując ogólne informacje na temat cysteiny, Autorka cytuje aż cztery pozycje literaturowe, którymi są podstawowe podręczniki biochemii, przy czym ten sam podręcznik w różnych wydaniach językowych jest cytowany dwukrotnie (np. Berg, Tymoczko, lub Voet). Uważam, że w takim przypadku zacytowanie jednego podręcznika jest w zupełności wystarczające. Na str. 27 Doktorantka użyła sformułowania, że „GSH jest kluczowym elementem szlaku detoksykacji w cytochromie P450”, co nie jest do końca zgodne z prawdą, ponieważ GSH bierze udział w drugiej fazie detoksykacji, a cytochrom P450 odpowiada za pierwszą fazę. GSH raczej współdziała z cytochromem P450 biorąc udział w sprzęganiu metabolitów powstałych z udziałem cytochromu P450.

Na str. 28 po zdaniu „w ostatnich latach suplementacja i stosowanie prekursorów GSH...” przydałoby się zacytowanie literatury. Polemizowałabym ze stwierdzeniem iż kwas alfa-liponowy – jest rozpuszczalny zarówno w wodzie, jak i w tłuszczach, ponieważ jego rozpuszczalność w wodzie jest niewielka.

W niektórych przypadkach sugerowałabym ograniczenie ilości cytowanych pozycji literaturowych. Dla przykładu po zdaniu „W klinicznej ocenie zmian białek w osoczu stosuje się kilka istotnych pojęć” – cytowane jest aż 11 pozycji literatury. Z kolei przy omawianiu białek ostrej fazy Autorka nie zacytowała żadnej literatury przez ponad stronę, a następnie umieściła 5 pozycji do zdania, że albumina stanowi 60% wszystkich białek osocza (str. 35). Z kolei w przypadku Tf czy Fg po pierwszym zdaniu jest cytowane parę pozycji, a potem długi fragment tekstu bez żadnej cytacji. W mojej opinii te cytowania można byłoby rozmieścić bardziej adekwatnie do treści.

W rozdziale 3 (str. 54) opisano dwie grupy badane pacjentów z RZS – pacjenci hospitalizowani (grupa I) i pacjenci niehospitalizowani (grupa II), podczas gdy wyniki przedstawione zostały ogólnie dla grupy badanej.

W przedstawionej dysertacji znalazłam zaledwie parę błędów edytorskich lub literowych, co świadczy o niezwyklej staranności Doktorantki, zwłaszcza przy tak obszernej pracy.

Autorka rozwinęła skrót NADPH jako dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy, podczas gdy jest to fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego. Skoro Cys-Gly opisano jako L-cysteinylo-L-glicynę, a NAC to N-acetylo-L-cysteinę, to konsekwentnie Cys powinna oznaczać L-cysteinę, Gly – L-glicynę, a Ser – L-serynę. W skrócie TCEP- brakuje litery „f” - fosiny – zamiast fosfiny. Zamiast używanej przez Doktorantkę nazwy anion ponadtlenkowy (O_2^-), powinno być użyte raczej określenie anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\bullet}$).

Z ciekawości recenzenta proszę o wyjaśnienie, dlaczego dla oznaczania tioli w próbkach rzeczywistych pochodzących od pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów zastosowano metodę z zastosowaniem monobromobimanu, podczas gdy do oznaczania tioli w próbkach pochodzących od pacjentów po zakażeniu SARS-Cov-2 Doktorantka wybrała metodę wykorzystującą derywatyzację z udziałem ABD-F. Zastanawia mnie także, dlaczego w metodzie z mBBr nie oznaczano γ -Glu-Cys.

Podsumowanie i wnioski

W mojej ocenie przedstawiona rozprawa doktorska mgr Katarzyny Kurpet spełnia wszystkie warunki wymagane dla pracy doktorskiej i określone w artykule 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 65 poz. 695 z późn. zm.). Przedstawione wyniki mają duże znaczenie naukowe i potencjalne zastosowanie praktyczne w diagnostyce medycznej. Na podkreślenie zasługuje interdyscyplinarny charakter pracy, samodzielność Autorki oraz wysoki poziom metodologiczny badań. Mimo moich uwag przedstawionych z obowiązku recenzenta, rozprawę doktorską Pani magister Katarzyny Kurpet oceniam bardzo wysoko. Praca ma charakter nowatorski, przeprowadzone badania zostały dobrze zaplanowane i bardzo starannie wykonane, a cel wyznaczony przez Doktorantkę został zrealizowany. Dlatego też zwracam się z wnioskiem o dopuszczenie mgr Katarzyny Kurpet do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę ogrom pracy doświadczalnej, bardzo dużą staranność rozprawy oraz jej interdyscyplinarny i nowatorski charakter, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.

Katedra Biochemii Lekarskiej UJ CM
Zakład Biochemii i Chemii Medycznej
Małgorzata Iciek
dr hab. Małgorzata Iciek
adiunkt