

Ocena rozprawy doktorskiej

pt.: „Opracowanie specyficznych procedur spektralnych poszukiwania wskaźników wybranych jednostek chorobowych w próbkach klinicznych”

mgr Katarzyny Jabłonki-Salach

Promotor: Prof. dr hab. Ewa Bulska

Pracownia Teoretycznych Podstaw Chemii Analitycznej

Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi interesującą próbę opracowania procedur analitycznych możliwych do zastosowania w diagnostyce laboratoryjnej i opartych o najnowocześniejszą aparaturę, rzadko jeszcze, niestety, wykorzystywaną w rutynowych oznaczeniach w materiale biologicznym. Postęp technologiczny w zakresie konstruowania i produkcji aparatury dla analityki chemicznej wkracza również do diagnostyki laboratoryjnej, wymagającej szybkich i czułych metod do rutynowych i masowych oznaczeń parametrów biochemicznych w laboratoriach szpitalnych i klinikach. Oferta aparatury do tego typu oznaczeń, a także badań genetycznych, immunoenzymatycznych, w zakresie biologii molekularnej jest bardzo szeroka, coraz bardziej nowoczesna i zapewnia wysoki poziom wykonywanych analiz. Obserwując wyposażenie tych laboratoriów zauważa się jednak często brak możliwości oznaczania w materiale biologicznym pierwiastków, zwłaszcza śladowych i ultraśladowych, nowoczesnymi metodami z użyciem spektrometrów najnowszych generacji, pozwalających na oznaczenia nie tylko w płynach biologicznych, ale również w tkankach miękkich i twardych. Laboratoria diagnostyczne, z uwagi na konieczność przeprowadzania w krótkim czasie licznych analiz korzystają z aparatury umożliwiającej kompleksowe i jednoczesne oznaczenia przynajmniej kilku parametrów korzystając z gotowych procedur, dostarczonych przez producenta i dopasowanych do oznaczeń w konkretnym materiale biologicznym, którym często jest osocze lub surowica, mocz lub inne płyny fizjologiczne. Wprowadzenie do diagnostyki laboratoryjnej rutynowych oznaczeń pierwiastków śladowych napotyka na trudności od dawna, a przeszkodą jest między innymi brak rekomendacji do ich rutynowe-

go przeprowadzania podczas diagnozowania pacjenta oraz kosztowna aparatura, wymagająca profesjonalnej i wysoko wyspecjalizowanej obsługi. Zwykle potrzebniejszy wydaje się zakup cytometru przepływowego lub tomografu komputerowego czy ultrasonografu. Wydaje się, że jedynym rozwiązaniem w obecnej sytuacji jest korzystanie przez klinicystów z analiz pierwiastków śladowych przeprowadzanych w wyspecjalizowanych i certyfikowanych laboratoriach działających poza jednostkami służby zdrowia. Laboratoria takie powstają i oferują swe usługi, jednak w ograniczonym zakresie, proponując analizy wybranych tylko pierwiastków w rutynowo pobieranym materiale biologicznym, najczęściej osoczu, surowicy lub moczu, rzadziej we włosach. Te niedomogi obserwowane w diagnostyce laboratoryjnej mają szansę być zminimalizowane poprzez upowszechnienie procedur oznaczania pierwiastków w oparciu o nowoczesną aparaturę jaką jest spektrometria mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej. Warunkiem przeprowadzenia takich analiz jest dostępność aparatury i opracowanie metodyki oznaczania oraz sposobu przygotowania materiału biologicznego, zwłaszcza stałego, np. prób tkanek miękkich i twardych.

Próby przygotowania takich procedur dla wybranych, nierutynowych oznaczeń w materiale biologicznym podjęła się Pani mgr Katarzyna Jabłonka-Salach w swej rozprawie doktorskiej. Zamiarem Doktorantki było wykazanie przydatności unikalnej techniki, spektrometrii masowej z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej, połączonej dla części badań z ablacją laserową, oraz stosowanej już wcześniej atomowej spektrometrii absorpcyjnej do analizy pierwiastków w próbach materiału biologicznego (tkanki mózgu i jajników, pełna krew i osocze) i wykorzystania wyników analiz do celów naukowych i diagnostycznych.

Rozprawa doktorska składa się z siedmiu głównych rozdziałów, wykazu piśmiennictwa, stosowanych skrótów i tabel i rysunków. Część wstępna zawiera obszerną charakterystykę materiału biologicznego podzieloną na dwa podrozdziały „Rutynowe metody diagnostyczne” i „Nierutynowe badania próbek klinicznych”, co niezbyt trafnie określa ich zawartość, gdyż Doktorantka przedstawia w nich skład, funkcje i parametry płynów fizjologicznych (krew, mocz, ślina) i tkanek, a nie metody diagnostyczne. Jak wynika z lektury dalszych części Wprowadzenia, główny akcent w rozprawie położony został na wykorzystanie metod spektralnych do oznaczania pierwiastków w próbach biologicznych i słusznie przedstawione zostały w tej części dwie najważniejsze i najczęściej stosowane techniki pomiarowe: atomowa spektrometria absorpcyjna, zarówno z atomizacją w płomieniu jak i elektrotermiczną, oraz spektrometria mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej. Bardzo rzetelnie i wyczerpująco opisane zostały metody i procedury pomiarowe stosowane w chemii analitycznej niezbędne dla uzyskania wiarygodnych wyników. Doktorantka przedstawiła istotę kalibracji,

metody jej przeprowadzania, konieczność stosowania właściwych wzorców i materiałów odniesienia, również tych certyfikowanych (CRM), niezbędnych dla optymalizacji i walidacji procedur analitycznych. Wskazała na problem znany chemikom analitykom, jakim jest trudność przy analizie materiału biologicznego, zwłaszcza tkanek, w uzyskaniu CRM o składzie zbliżonym do analizowanych prób, wymagających zwrócenia uwagi na ich skład chemiczny, stężenie oznaczanego składnika, rodzaj matrycy lub konieczność stosowania kilku materiałów odniesienia jednocześnie. Doktorantka przedstawiła parametry ważne dla uzyskania wiarygodnych wyników w analizie chemicznej, jakimi są granica wykrywalności i oznaczalności, czułość metody, zakres liniowości krzywej kalibracyjnej oraz określenie przedziału ufności dla wyniku pomiaru. W podsumowaniu części wstępnej znalazły się uwagi o możliwości popełnienia błędów na etapie pobierania i przygotowania prób materiału biologicznego, wskazanie na konieczność optymalizacji warunków pomiaru sygnału analitycznego, wyboru odpowiedniej metody wzorcowania oraz oceny statystycznej wyników.

Celem pracy było opracowanie trzech nierutynowych procedur pomiarowych oznaczania wybranych pierwiastków w różnym materiale biologicznych i wykazanie ich przydatności do diagnozowania chorób i jednocześnie przeprowadzenia badania naukowego. Przedstawienie celu badań uważam jednak za zbyt szczegółowe, część informacji należałoby umieścić w opisie badanych grup pacjentów i metodyki oznaczeń, również dlatego, że każdy z trzech problemów badawczych poprzedza odrębne wprowadzenie i cel.

W kolejnym rozdziale Doktorantka przedstawiła stosowaną aparaturę, odczynniki i materiały odniesienia, pochodzenie prób ludzkiego materiału biologicznego oraz uchwałę Komisji Bioetycznej Wojskowego Instytutu Medycznego, która przedstawiona w formie kopii nie zawiera jednak tytułu projektu badawczego, nazwiska właściwego badacza oraz stwierdzenia zgody na przeprowadzenie badań.

Część badawcza pracy zawarta została w kolejnych trzech rozdziałach, które stanowią odrębnie realizowane badania zawierające wybór metody i przygotowanie procedury analitycznej, zależnie od wybranego problemu badawczego. Doktorantka przeprowadziła rzetelne i wnikliwe rozpoznania literaturowe dla każdego z badań, wyczerpująco przedstawiła biochemiczne i patofizjologiczne uzasadnienie ich podjęcia oraz cel wykazując wartość podkreślenia dociekliwość. Opis problemu niekiedy jest nawet zbyt szczegółowy i nie wiąże się ściśle z równie szeroko przedstawionym celem, zawierając np. opisy objawów klinicznych i metod leczenia choroby Wilsona czy nowotworów jajnika.

Za istotne i najważniejsze osiągnięcie każdego z badań i tym samym całej pracy uważam autorskie opracowanie przez Doktorantkę procedury oznaczeń wybranych pierwiastków

w materiale biologicznym, które mają charakter nierutynowy, są oryginalnym wkładem do zestawu analiz w ramach diagnostyki laboratoryjnej. Pozwalają wykorzystać nowoczesną aparaturę spektralną i dają wgląd w złożoność i specyfikę materiału biologicznego, wymagającego szczególnej procedury przygotowania analitu do oznaczeń. Każda z opisanych procedur stanowi jednocześnie gotowy przewodnik po tym jak pobrać i przygotować krew czy tkanki do oznaczeń pierwiastków, jak optymalizować układ pomiarowy ICP MS, przeprowadzić wzorcowanie, użyć właściwy materiał odniesienia. W nieco zmodyfikowanej i przereklamowanej formie każda z tych części metodycznych pracy doktorskiej może stanowić instrukcję gotową do użycia w laboratorium diagnostycznym przez chemika analityka pod warunkiem dostępności nowoczesnego aparatu jakim jest spektrometr mas z plazmą indukcyjnie sprzężoną. Uważam to za oryginalne osiągnięcie Doktorantki, świadczące jednocześnie o doskonałym opanowaniu warsztatu badawczego.

Wszystkie badania prowadzono we współpracy z jednostkami klinicznymi, co gwarantowało pozyskanie właściwego materiału badawczego. Pierwsze z przedstawionych badań, jakim była ocena wpływu palenia tytoniu na stężenie ołowiu we krwi pełnej i osoczu kobiet ciężarnych, palących i niepalących, prowadzono we współpracy z Warszawskim Uniwersyteciem Medycznym (raczej nie Warszawskim Instytutem Medycznym?). W opisie materiału i procedury oznaczeń podano mylnie, że oznaczenia pierwiastków wykonano w surowicy krwi, co po pobraniu krwi do próbek zawierających wersenian potasowy jako antykoagulant jest raczej niemożliwe, ponadto opisy rysunków 20 i 21 wskazują na wykonanie oznaczeń w pełnej krwi i osoczu. Wyniki tamże przedstawione wskazują na różnice stężeń ołowiu między grupami palących i niepalących kobiet ciężarnych, jednak nie potwierdzono tego statystycznie, gdyż brak na rycinach wartości odchylenia standardowego i współczynnika ufności p . Podobnie na stronie 83 oraz kolejnej (pkt. 4.7. Wnioski) Autorka pracy podaje, że „...stężenie ołowiu w osoczu i krwi pełnej jest ściśle powiązane zarówno z poziomem kotyniny we krwi, liczba wypalanych dziennie papierosów, długością trwania nałogu... oraz masą urodzeniową dziecka.” Jednak nie znalazłam w tekście pracy wyjaśnienia jak oceniono te zależności, brak również ewentualnie obliczonych współczynników korelacji. Statystycznie potwierdzono jedynie istotnie mniejszą masę urodzonych dzieci w grupie palących kobiet w porównaniu z niepalącymi (Tabela 7, str. 73). Tym samym wnioski z tej części pracy (strona 84) powinny zostać zweryfikowane. Wyniki tych badań zostały opublikowane wcześniej w dwóch czasopismach naukowych (*Biol. Trace Elem. Res.*, 155, 2013, 169-175 oraz *Medycyna Wieku Rozwojowego*, 3, 2012, 196-204), gdzie dane, o których piszę powyżej zostały zamieszczone prawidłowo, a zatem powinny również znaleźć się w pracy doktorskiej.

Kolejne badanie dotyczyło opracowania procedury oznaczania miedzi oraz innych pierwiastków śladowych (Fe, Mn i Zn) w wybranych obszarach mózgu ludzkiego, próbkach pobranych od pacjentów ze zdiagnozowaną chorobą Wilsona oraz osób bez urazów mózgu (grupa porównawcza). Próby tkanek mózgu uzyskano z Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie. Badania przeprowadzono *post mortem*, ich wyniki mogły więc jedynie być wykorzystane do celów naukowych, co zresztą zakładała Doktorantka. Możliwość wykorzystania tej procedury w diagnostyce laboratoryjnej jest niewielka z uwagi na brak dostępności tego rodzaju materiału od osób żywych. Celem badań było więc ustalenie czy w chorobie Wilsona zaburzenie metabolizmu miedzi wiąże się ze zmianami stężeń innych istotnych pierwiastków śladowych i wywołanych nimi objawów neurologicznych. Doktorantka wyjątkowo wnikliwie przedstawiła patogenezę choroby i wybór procedury analitycznej, w której wykorzystywała dwie techniki: ICP MS dla oznaczeń Cu, Mn i Zn oraz płomieniowej ASA dla Fe i dodatkowo Cu. Przedstawiła uzasadnienie takiego wyboru opierając się między innymi na wyznaczonych granicach wykrywalności i oznaczalności oraz interferencji izobarycznych i wieloatomowych, dokonała optymalizacji obu procedur w oparciu o wybrane certyfikowane materiały odniesienia, wyznaczyła krzywe kalibracyjne. Zweryfikowała również efektywność trzech metod mineralizacji mikrofalowej niewielkich prób czterech różnych materiałów certyfikowanych, zbliżonych składem do tkanki mózgu. Uzyskała tym samym wiarygodną metodę oznaczania wybranych pierwiastków w tkance mózgowej. Mogę uznać tę część badań za cenne osiągnięcie Doktorantki, które, jak wspomniałam wcześniej, może stanowić rekomendowaną procedurę gotową do wykorzystania w laboratoriach diagnostycznych, wyposażonych w spektrometry ASA i ICP MS. Wyniki tej części badań potwierdziły gromadzenie miedzi w tkance mózgowej u pacjentów z chorobą Wilsona oraz brak istotnych różnic stężeń Fe, Mn i Zn w porównaniu z osobami zdrowymi. Pewną wartość w praktyce klinicznej może mieć ocena skuteczności terapii usuwającej nadmiar miedzi z mózgu, a pośrednio z organizmu chorego, która nie wykazała różnic przy stosowaniu D-penicylaminy oraz soli cynku. Prawdopodobnie niewielka liczebność badanych grup ($n=8$ oraz $n=4$), zrozumiwała przy ocenie tak trudno dostępnego materiału biologicznego, wpłynęła na taki wynik porównania. Ponadto potwierdzony został zaburzony metabolizm miedzi jako głównej przyczyny choroby Wilsona, choć dla pełnej diagnozy tej choroby niezbędne jest przeprowadzenie również innych badań, w tym wymienionych przez Doktorantkę w pkt. 5.2 (Diagnostyka i leczenie). Uzupełnienia wymaga jedynie stwierdzenie we Wnioskach (str. 116), że potwierdzono dodatnią korelację stężenia miedzi w skorupie (PT) oraz żelaza w mózdzku (ND) z czasem trwania choroby, gdyż danych na ten temat nie znalazłam w treści pracy (brak współczynników korelacji i wartości p). Wyniki tych

badania znalazły uznanie recenzentów czasopism, w których opublikowano je w latach 2013-2014 (*J. Neural Transmission*, 121, 2014, 1273-1279 oraz *J. Neur. Sci.*, 329, 2013, 55-58).

Celem ostatniej części ocena przydatności techniki ICP MS z ablacją laserową (LA) do badania rozmieszczenia pierwiastków w tkance jajników ludzkich objętych procesem nowotworowym. Doktorantka przedstawiła szeroko, co niezupełnie było uzasadnione, budowę jajnika oraz klasyfikację i stopnie zaawansowania nowotworów jajnika. Problem naukowy sprowadzał się do pytania o różnice w rozmieszczeniu wybranych pierwiastków w tkance jajników zdrowych oraz z nowotworem. Badanie tego rodzaju stało się możliwe od niedawna po wyposażeniu spektrometru ICP MS w laser, umożliwiający ablację próby stałej tkanki i tzw. mapowanie pierwiastków. Próby tkanek jajników uzyskano od pacjentek Wojskowego Instytutu Medycznego w Warszawie. Badane grupy, z chorobą nowotworową jajnika oraz porównawcza bez tej choroby, obejmowały tylko po dwie pacjentki, dlatego trudno było w tym przypadku oceniać uzyskane wyniki statystycznie. Niemniej Doktorantka przeprowadziła precyzyjną optymalizację układu LA ICP MS, ustaliła parametry pracy lasera (energia i średnica wiązki lasera, częstotliwość pulsu, szybkość skanowania próbki) i pomiarowe układu, sposób przechowywania prób (formalina, sól fizjologiczna). Uzyskane wyniki wskazują na wprost proporcjonalną intensywność sygnałów dla Mg, Mn i Fe (tzw. stosunek intensywności zliczeń odpowiednich izotopów do ^{13}C) oraz Cu i Zn w tkance nowotworowej. Autorka określa te zależności korelacją, co jest niepoprawne z powodu braku możliwości oceny statystycznej i obliczenia współczynnika korelacji. Wprawdzie procedura ta nie daje bezpośredniej informacji o stężeniu pierwiastka, pozwala jednak ocenić jego lokalizację i nierównomierność gromadzenia. Może wskazywać na obszary objęte procesem nowotworzenia, co jest dużym osiągnięciem nowoczesnej analityki chemicznej. Wydaje się, że tego rodzaju mapowanie pierwiastków w tkankach powinno być prowadzone równoległe z badaniem histopatologicznym, lokalizującym struktury komórkowe, a dalej makrocząsteczki, np. białka lub enzymy wiążące jony metali. Wydaje się, że dopiero taka pełna informacja pozwoliłaby wyjaśnić przyczynę nadmiernego gromadzenia niektórych pierwiastków (np. Cu, Mg, Fe) wiązanych przez specyficzne białka, w tkance nowotworowej, co stwierdzono wcześniej w osoczu w badaniach innych autorów w odniesieniu do nowotworów jelita grubego, piersi, płuc czy przewodu pokarmowego (np. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 15, 2001, 193-196 oraz *Trace Elem. Electrolytes*, 21, 2004, 336-339).

Z obowiązku recenzenta pragnę zwrócić uwagę na pewne niekonsekwencje zauważone z różnych fragmentach rozprawy, które nie zmieniają mej pozytywnej opinii o pracy, lecz

mogłyby zostać uwzględnione podczas ewentualnego przygotowania publikacji. Należą do nich:

- stosowanie pojęcia „zawartość” lub „poziom” zamiast prawidłowego „stężenie”,
- konieczne jest podanie źródła niektórych zestawień, procedur leczenia, klasyfikacji chorób, itp.,
- stosowanie jednolitej nazwy atomowej spektrometrii absorpcyjnej (ASA).

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska została przygotowana poprawnie pod względem językowym i formalnym. Na podkreślenie zasługuje aktualność i celowość przeprowadzonych badań, niewątpliwie wymagały one dużego nakładu pracy, czasu, wytrwałości w pozyskiwaniu materiału do badań. Należy docenić zainteresowanie Doktorantki aktualnymi problemami naukowymi i klinicznymi, umiejętność wykorzystania nowoczesnego warsztatu badawczego. Opracowane procedury analityczne i uzyskane wyniki stanowią istotny wkład w wykorzystania nowoczesnych spektralnych metod analitycznych w diagnostyce laboratoryjnej.

Podsumowując, w mej opinii praca doktorska pt.: „**Opracowanie specyficznych procedur spektralnych poszukiwania wskaźników wybranych jednostek chorobowych w próbkach klinicznych**” spełnia wymogi stawiane przez ustawodawcę rozprawom doktorskim. Uważam, że Doktorantka jest w pełni dojrzałą kandydatką do organizowania i prowadzenia badań naukowych, spełnia tym samym kryteria stawiane pracownikom naukowym ubiegającym się o stopień naukowy doktora nauk chemicznych.

Na tej podstawie stawiam wniosek do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr Katarzyny Jablonki-Salach do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Poznań, 12.08.2016 r.

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