

Prof. dr hab. inż. Marek Biziuk,
prof. zw. Politechniki Gdańskiej
Wydział Chemiczny
Politechniki Gdańskiej

Gdańsk 14.07.2016

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr

Katarzyny JABŁONKA-SALACH

zatytułowanej

Opracowanie specyficznych procedur spektralnych poszukiwania wskaźników wybranych jednostek chorobowych w próbkach klinicznych

wykonanej w Pracowni Teoretycznych Podstaw Chemii Analitycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Ewy Bulskiej

Z dużym zainteresowaniem przeczytałem przesłaną mi do recenzji pracę mgr Jabłonka-Salach, dotyczy ona bowiem bardzo interesującego problemu związanego z diagnostyką chorób poprzez oznaczanie wybranych wskaźników z wykorzystaniem technik spektrofotometrycznych. Praca dobrze wpisuje się w nowoczesne trendy w Chemii Analitycznej. Analityka chemiczna jest, z założenia, dziedziną interdyscyplinarną, a poszukiwania możliwości wsparcia diagnostyki medycznej wynikami oznaczeń wybranych parametrów w próbkach klinicznych są jednym z najbardziej aktualnych obszarów badań. Dobrze się stało, że wyzwanie to podjęła w swojej pracy Pani mgr Jabłonka-Salach. Badania próbek klinicznych, ze względu na skomplikowaną matrycę, są zagadnieniem niezmiernie skomplikowanym, pracochłonnym, czasochłonnym i, co jest najważniejsze, wymagającym nowoczesnego wyposażenia oraz wysoko wykwalifikowanej kadry. Nic więc dziwnego, że badaniami tego typu zajmuje się na świecie niewiele laboratoriów. W Polsce takie badania prowadzone są w Pracowni Teoretycznych Podstaw Chemii Analitycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, w której Doktorantka wykonywała swoją pracę, a więc miała ona możliwość wykorzystania dotychczasowych już istniejących opracowań oraz doświadczenia pracujących tam ludzi. Doktorantka miała szansę do nabycia nowych doświadczeń także poprzez współpracę z czterema renomowanymi ośrodkami naukowymi, a więc: Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych Uniwersytetu Warszawskiego, Instytutem Matki i Dziecka w Warszawie, Instytutem Psychiatrii i Neurologii w Warszawie oraz Wojskowym Instytutem Medycznym w Warszawie. Na podkreślenie zasługuje rozległość tematyki badań we współpracy z wymienionymi ośrodkami oraz jej aktualność i ścisłość

powiązanie ze społecznym zapotrzebowaniem. Nie jest to, na pewno, praca, którą można odłożyć na półkę. Badania, będące treścią recenzowanej pracy, szczególnie próba powiązania różnic w zawartości niektórych pierwiastków w próbkach klinicznych pochodzących od ludzi zdrowych i chorych oraz ich rozmieszczenia w tkankach z chorobami, na które cierpią pacjenci, a także opracowanie i zwalidowanie metodyk oznaczania tych pierwiastków, należy uznać za niezmiernie istotne. Był to więc program szeroki i ambitny. Generalnie, koncepcję pracy oceniam bardzo wysoko i dobrze się stało, że taka praca powstała. Należy wyrazić duże uznanie dla autorki, że podjęła się realizacji tak ważnego, a jednocześnie trudnego w realizacji tematu.

W skład recenzowanej rozprawy wchodzi: *Wprowadzenie*, *Cel pracy*, część doświadczalna składająca się z trzech obszernych, niezależnych rozdziałów związanych z różnymi rozwiązywanymi zagadnieniami, w których omówiono procedury oznaczeń, wyniki oraz wnioski, *Podsumowanie*, *Wykaz stosowanych skrótów i akronimów*, *Wykaz tabel i rysunków*, *Spis publikacji* oraz *Bibliografia*. Jest to klasyczny układ rozpraw doktorskich. Jest także streszczenia w języku angielskim, które umożliwia zapoznanie się z głównymi tezami pracy, a szczególnie wynikami i wnioskami, także zainteresowanym tematem, którzy nie znają języka polskiego. Dziwne, że nie znalazło się ono w *Spisie treści*. Łącznie praca obejmuje 181 stron, zawiera 47 rysunków i 34 tabele. Jest także spis tabel i rysunków. W *Wykazie stosowanych skrótów i akronimów* jest jedna nieścisłość w nazwie AFS.

Wprowadzenie, otwierające część literaturową, ma, niezgodnie z tytułem, charakter streszczenia pracy. W części literaturowej Doktorantka opisała szczegółowo rodzaje rutynowych próbek klinicznych, a więc krew oraz mocz, ich charakterystykę, a także najczęściej oceniane parametry. Niestety, Rys. 6, podobnie jak późniejszy Rys. 16 są mało czytelne. W dalszej części Doktorantka opisała inne, nierutynowe próbki biologiczne, a więc włosy, ślinę, mleko ludzkie oraz tkanki. Zgadzam się z Doktorantką, że w badaniach antydopingowych dobrym materiałem badawczym byłyby włosy i paznokcie, gdyż zapisana w nich historia kontaktów dotyczących sterydów, a także narkotyków, obejmuje znacznie dłuższy okres, niż w przypadku krwi i moczu. W dalszej części Doktorantka opisała techniki i metody wykorzystywane do badań próbek klinicznych ze szczególnym uwzględnieniem technik spektroskopowych. Zabrakło mi przy omawianiu absorpcyjnej spektrometrii atomowej omówienia techniki wodorkowej oraz monochromatyzacji z zastosowaniem koła Rowlanda. W przypadku aerozolu mówimy raczej o kropli, a nie o ziarnie. Szczególnie ciekawe są fragmenty poświęcone spektrometrii mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej z ablacją laserową. Interesujące i przydatne dydaktycznie jest też omówienie charakterystyki analitycznej procedur pomiarowych, a szczególnie Tabela 5. Lepiej by jednak było, gdyby ta tabela znalazła się na jednej stronie. Dlaczego w pracy stosowano wymiennie: *krzywa kalibracyjna*, *krzywa kalibrowania* oraz *zależność kalibracyjna*? Nie jest wyjaśnione czego dotyczą odnośniki w ramkach. Niezbyt czytelny jest też opis Rysunku 10 oraz metody

wzorca wewnętrznego. W rozdziale tym Doktorantka wykazała się interdyscyplinarnymi wiadomościami z zakresu chemii analitycznej, biologii i medycyny. Obszerna i wyczerpująca część teoretyczna jest dobrym wprowadzeniem do pracy i bardzo dobrze uzasadnia jej cel. Może być również dobrym materiałem do monografii lub artykułu popularno-naukowego.

Najważniejszą częścią każdej pracy doktorskiej są jednak wyniki, ich dyskusja oraz wnioski. W przypadku recenzowanej pracy mamy do czynienia z trzema problemami, mianowicie:

- badanie próbek krwi vs. palenie tytoniu a rozwój prenatalny;
- badanie tkanek mózgu vs. choroba Wilsona oraz
- badanie tkanek jajników vs. nowotwory jajnika.

W każdym przypadku bardzo drobiazgowo omówiono objawy choroby oraz metody leczenia. Bardzo interesujące są rozważania dotyczące skutków palenia tytoniu przez kobiety w ciąży. Ta część pracy nadaje się na samodzielny artykuł przestrzegający przed paleniem papierosów przez ciężarne kobiety. Dyskutowałbym jednak, czy palenie papierosów tak istotnie wpływa na poziom ołowiu we krwi pełnej i osoczu. Przeprowadzone przez mój zespół badania mleka matek sugerowałyby, że to raczej kadm jest markerem palenia papierosów, a w przypadku ołowiu, jego podwyższone zawartości wiązały się najczęściej z miejscem zamieszkania, np. w pobliżu uczęszczanych dróg, skrzyżowań itp. Wprawdzie badania te były wykonane przed 20 laty i problem ołowiu pochodzącego z benzyny mamy już za sobą (pozostały jednak depozyty), ale to kadm jest pierwiastkiem najbardziej związanym z paleniem papierosów, a nie ołów. Dlaczego nie starano się oznaczać tego pierwiastka? Oczywiście, zawartość kotyniny, metabolitu nikotyny, jest jeszcze lepszym wskaźnikiem palenia papierosów. W tabelach 9 i 13 nieprawidłowo podano wartości otrzymane dla ołowiu. Wynika z nich, że każdego z izotopów było tyle, ile wynosi całkowita zawartość. Metoda oznaczania Pb została częściowo zwalidowana. Na podkreślenie zasługuje dobór optymalnych warunków oznaczania Pb techniką ICP MS oraz zastosowanie do walidacji materiałów odniesienia. Przy przygotowaniu próbek stosujemy *mineralizację wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym*, a nie mineralizację mikrofalową. Dziwnie też brzmi zwrot *masa urodzeniowa kobiet palących*.

Bardzo ciekawa jest część rozprawy dotycząca badania tkanek mózgu w poszukiwaniu korelacji zawartości w nich żelaza, miedzi, cynku i manganu a chorobą Wilsona. Jest to choroba bardzo rzadka (na szczęście, nie niestety) i dlatego, niesłusznie, lekceważona, a przecież prowadzi do uszkodzenia wątroby oraz objawów neurologicznych i psychicznych, a nawet śmierci, co bardzo szczegółowo opisała Doktorantka w swojej pracy. W tej części pracy chyba najbardziej uwidoczniło się zainteresowanie Doktorantki medycyną. Nie rozumiem jednak co Doktorantka miała na myśli pisząc o *różnym powinowactwie tkanek na nadmiar jonów miedzi*. Doktorantka zastosowała w tym przypadku dwie techniki pomiarowe, ICP MS oraz F AAS, dobierając optymalne parametry oraz

walidując obie techniki z wykorzystaniem czterech materiałów odniesienia. Na podkreślenie zasługuje fakt, że wyniki uzyskane z wykorzystaniem obu technik są zgodne. Cenne jest też porównanie efektywności mineralizacji trzema sposobami. Doktorantka stwierdziła istotne różnice w zawartości miedzi w różnych fragmentach mózgu u osób chorych na chorobę Wilsona i u grupy kontrolnej. W przypadku manganu i cynku nie stwierdzono istotnych różnic, a w przypadku żelaza potrzebne są chyba dalsze badania.

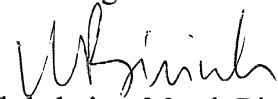
Trzecia część badań, wchodzących w skład rozprawy doktorskiej dotyczy badanie rozmieszczenia pierwiastków w tkankach jajników ludzkich objętych chorobą nowotworową. Są to jednak, według mnie, badania pilotowe, gdyż dotyczyły jedynie dwóch kobiet chorych i dwóch zdrowych. Tym niemniej, należy podkreślić, że w procedurze badań z wykorzystaniem techniki spektrometrii mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej połączonej z ablacją laserową dobrano optymalne parametry pracy, a także zwalidowaną ją udowadniając przydatność do oznaczania Cu, Zn, Mg, Mn i Fe w tkankach jajników. Na podkreślenie zasługuje drobiazgowo zbadanie przydatności ablacji laserowej oraz sposobu przechowywania próbek. Nie wiem o co chodzi w sformułowaniu *trudności w zawartości pierwiastków, czy zawartość ślepej próby* (str. 133).

Cytowana literatura jest bardzo obszerna (292 pozycje) i bardzo aktualna. Zdecydowana większość cytowanej literatury pochodzi z lat 2000-2016. Świadczy to o skrupulatnym zapoznaniu się Doktorantki z najnowszymi osiągnięciami w omawianej dziedzinie. Brak jest jednak konsekwencji w stosowaniu zwyczajowych skrótów tytułów czasopism, stawianiu przecinków, kropek i cudzysłowu przy cytowaniu oraz sposobie cytowania prac zbiorowych. Brak jest czasem miejsc wydania (poz. 4 i 139) oraz dat dostępu przy cytowaniu materiałów internetowych. Cytowanie w pozycjach 202 i 222 jest niepełne.

Podsumowując, należy z uznaniem podkreślić świetnie zaplanowany i zrealizowany obszerny program badań. Poza ilością prezentowanych wyników uderza duża dojrzałość i dociekliwość w interpretacji oraz wyciąganiu wniosków z przeprowadzonych badań, także w przypadku wyników negatywnych. Doktorantka opracowała cztery procedury oznaczania wybranych pierwiastków w próbkach klinicznych wykorzystując najnowsze osiągnięcia chemii analitycznej. Po dobraniu optymalnych parametrów opracowywanych metodyk, Doktorantka przeprowadziła również ich częściową walidację, wyznaczając granice wykrywalności, liniowość, czułość oraz precyzję metod. Opracowane metodyki zostały z powodzeniem zastosowane do oznaczania zawartości analizowanych pierwiastków w próbkach klinicznych pochodzących od ludzi chorych i od grupy kontrolnej. Praca napisana jest ładną polszczyzną, a na specjalne podkreślenie zasługuje staranna, nowoczesna i atrakcyjna edycja, szczególnie duża ilość rysunków i tabel bardzo poglądowo prezentujących otrzymane wyniki. Ciekawym i dydaktycznie słusznym pomysłem jest wprowadzanie pewnych kluczowych definicji w ramkach. Doktorantka popełniła w tekście pracy stosunkowo niewiele błędów nomenklaturowych i stylistycznych. Błędy stylistyczne,

literówki i interpunkcje zaznaczyłem w tekście pracy i omówiłem już z autorką. Niektóre literówki wzbudzają uśmiech czytającego, np. *obecność (pierwiastków) w orgazmie* (str. 33) czy *niegodne ze stanem naturalnym* (str. 49). Chciałbym jedynie zwrócić uwagę na pewne potknięcia. „Żargonem pracownianym” wydają mi się takie określenia, jak: *wiarygodność* zamiast *miarodajność* (wynik jest podstawą miary nie wiary), *próbkiowanie* zamiast *pobieranie próbek*, *syntetyzować* zamiast *syntezować*, *ekspozycję pierwiastka* zamiast *na pierwiastek*, *stworzenie procedury* zamiast *opracowanie procedury*, *poddane badaniom* zamiast *zbadane*, *uzależniony jest od* zamiast *zależy od*, czy *izotop posiada interferencje* zamiast *występują interferencje*. Określenie *optymalizacja* jest zarezerwowane dla procedur statystycznych, takich jak metoda simpleksów, plany Placketta-Burmana, plany kompozycyjne Boxa-Huntera itp. W przypadkach opisywanych w pracy jest to dobór najkorzystniejszych parametrów procesu. Dlaczego stosowano wymiennie: krzywa kalibracyjna, krzywa kalibrowania oraz zależność kalibracyjna? Przy oznaczaniu zawartości śladowych niepewność wyniku, czy odchylenie standardowe należy podawać z dwiema cyframi znaczącymi, a wynik najwyżej z trzema. Podobnie, granice oznaczalności należy podawać najwyżej z dwiema cyframi znaczącymi. Nie stawiamy spacji pomiędzy nazwą związku a wartościowością pierwiastka, np. *kwaz azotowy(V)*. W języku polskim dziesiątę oddzielamy przecinkiem, nie kropką, a po dwukropku tekst zaczynamy od małej litery.

Moje uwagi krytyczne co do redakcyjnej strony pracy nie umniejszają jednak jej dużej wartości merytorycznej. Przeprowadzone i zaprezentowane w pracy badania zawierają dużo elementów nowości naukowej. Pracę czyta się z dużym zainteresowaniem i może być ona źródłem ciekawych informacji dla wszystkich naukowców i studentów zajmujących się diagnostyką chorób poprzez oznaczanie wybranych wskaźników w próbkach klinicznych. Doktorantka zrealizowała obszerny i ambitny program badań. Wyniki pracy zostały już częściowo opublikowane w 6 pracach: *Journal of Neural Transmission* (IF = 2,871), *Biological Trace Element Research* (IF = 1,923), *Neurochemical Research* (IF = 2,551), *Journal of Neurological Sciences* (IF = 2,262), *Medycyna Wieku Rozwojowego* oraz *Analityka*. Dodatkowo, 2 prace są aktualnie w recenzji. Uważam, że recenzowana praca spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim w świetle przepisów zgodnych z Ustawą z dnia 27 lipca 2005 roku *Prawo o szkolnictwie wyższym, ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki* (Dz. U. nr 164, poz. 365) oraz Ustawą z dnia 18 marca 2011 r. o zmianie tej ustawy (Dz. U. z 2011 r. Nr 84, poz. 455) i wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Jabłonka-Salach do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


Prof. dr hab. inż. Marek Biziuk,
prof. zw. PG