

Prof. dr hab. Marek Trojanowicz
Instytut Chemii i Techniki Jądrowej
Laboratorium Jądrowych Techniki Analitycznych
ul. Dorodna 16, 03-185 Warszawa
Tel: (22) 554 1030,
trojan@chem.uw.edu.pl

Recenzja

pracy doktorskiej **mgr Kamila Strzelaka** zatytułowanej „*Mikrosoleniowodowe przepływowe systemy bioanalityczne do oznaczania wybranych analitów istotnych w diagnostyce medycznej*” wykonanej w ramach Międzywydziałowych Interdyscyplinarnych Studiów Doktoranckich w zakresie nauk Matematyczno-Przyrodniczych Uniwersytetu Warszawskiego

Recenzowana praca doktorska Pana mgr Kamila Strzelaka mieści się w bardzo ważnym nurcie rozwojowym współczesnej chemii analitycznej, którym jest miniaturyzacja i mechanizacja analitycznej aparatury pomiarowej. Badania te obejmujące poszukiwanie nowych konstrukcji urządzeń pomiarowych i badań dotyczących nowych koncepcji prowadzenia pomiarów analitycznych, prowadzą z reguły do obniżenia kosztów aparatury, a przez to do łatwiejszej jej dostępności i – co równie ważne – do poprawy precyzji i dokładności, a też i najczęściej do poprawy wydajności wykonywania analiz. Te wszystkie cechy mieszczą się wśród atrybutów analizy przepływowej, a i szerzej – chemii przepływowej, żywiłowo rozwijającej się w ostatnich latach również na potrzeby najbardziej wyszukanych syntez chemicznych.

To kolejny z kilkunastu już doktoratów przygotowanych na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego z dziedziny analizy przepływowej, tym razem w ramach Międzywydziałowych Interdyscyplinarnych Studiów Doktoranckich w zakresie nauk Matematyczno-Przyrodniczych. Doktorat ma bez wątpienia charakter interdyscyplinarny i jest wspólnie promowany przez Panią Prof. dr hab. med. Dagnę Bobilewicz z Zakładu Diagnostyki Laboratoryjnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego i Pana Prof. dr hab. Roberta Konckiego z Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Głównym przedmiotem badań zrealizowanych w ramach recenzowanego doktoratu, zorientowanych na potencjalne zastosowania w diagnostyce medycznej, jest konstrukcja zminiaturyzowanych układów przepływowych sterowanych elektronicznie z wykorzystaniem optoelektronicznych układów detekcyjnych. Szczególnie w zakresie badań podstawowych i konstrukcji optoelektronicznych detektorów przepływowych, zespół prof. R. Konckiego ma dobrze rozpoznawalne osiągnięcia w skali międzynarodowej i ich znaczne rozszerzenie stanowią prace mgr K. Strzelaka, będące przedmiotem recenzowanej pracy doktorskiej.

Mimo wcześniejszego opublikowania wyników tych badań w czasopismach naukowych, recenzowana rozprawa przygotowana jest w formie jednolitego tekstu na 140 stronach, zawierającego przegląd literatury, dotyczącej kilku aspektów przeprowadzonych badań, oraz opis skonstruowanych układów pomiarowych, optymalizacji ich funkcjonowania i wyników ich zastosowania do analizy próbek płynów fizjologicznych.

Ze względu na wybrany przez Autora obszar zastosowań konstruowanych układów pomiarowych do diagnostyki medycznej, duża część 54-stronnicowego wprowadzenia literaturowego, opartego na 200 cytowaniach literaturowych, poświęcona jest znaczeniu diagnostycz-

nemu i stosowanym w praktyce diagnostycznej metodom analitycznych oznaczeń wybranych markerów biochemicznych. Uważa się, że współczesna diagnostyka medyczna oferuje ponad 700 testów laboratoryjnych pomocnych w diagnozie różnych schorzeń, chociaż powszechnie do monitorowania stanu zdrowia pacjenta stosuje się mniej, niż 30 z nich (*Acc. Chem. Res.*, 31 (1998) 317). Są wśród nich anality wybrane do badań przez Autora, a więc enzymy z grupy fosfoesteraz, kreatynina jako przykładowa toksyna mocznicowa oraz albumina i całkowita zawartość białek. To przykłady parametrów powszechnie stosowanych w diagnostyce medycznej, stąd i literatura dotycząca ich roli w organizmie, znaczenia diagnostycznego, jak i metod ich oznaczania, jest niezwykle rozległa. Autor przedstawił bardzo dużo informacji o znaczeniu fizjologicznym oraz znaczeniu dla diagnostyki medycznej parametrów wybranych do własnych badań doświadczalnych. To bardzo ciekawie i syntetycznie napisana część pracy, dobrze ilustrująca rozległość badań prowadzonych w tym zakresie, chociaż mnogość publikowanych prac zmusza oczywiście do arbitralnie dokonywanego wyboru cytowanych prac. Przedstawione wyniki badań publikowanych w literaturze wskazują na aktualność tematyki poszukiwania nowych metod analitycznych, dotyczących analitów wybranych do badań przez Autora.

Opisano szereg grup metod analitycznych opracowanych dla badanych analitów, opisując wiele z nich bardziej szczegółowo – ale uważam też, że zbyt mało jest bardziej krytycznej oceny porównawczej zalet i trudności, wynikających z zastosowania wybranej techniki pomiarowej, czy właściwości chemicznych układu detekcyjnego (otrzymywanie i trwałość odczynników, selektywność i szybkość reakcji, czułość i wykrywalność samej detekcji itp.). W trafny sposób, w przypadku metod i instrumentacji, opracowanych do oznaczeń kreatyniny, sporo uwagi Autor poświęca zintegrowanym czujnikom i bioczujnikom, których szczególną zaletą może być indywidualne posługiwanie się nimi przez pacjentów. Nie pominięto również wielu różnych metod chromatograficznych i elektroforetycznych, chociaż ich zastosowania w rutynowych laboratoriach klinicznych należą chyba do rzadkości. Za bardzo dobre uważam również przedstawienie metod oznaczania białek ze szczególnym podkreśleniem metod immunochemicznych z różnymi metodami detekcji powstających kompleksów antygen-przeciwciała. Ponieważ praca dotyczy konkretnych zastosowań szkoda, że Autor w dość obszernym przeglądzie metod oznaczeń, tylko w pojedynczych przypadkach wskazał, które z tych metod najczęściej stosowane są rutynowo w laboratoriach diagnostycznych – i też jakie są ich wady, lub gdzie jest potrzeba autentycznych udoskonaleń.

W tej bardzo bogatej części literaturowej dobrze byłoby też zawrzeć jakieś bardziej ogólne wprowadzenie do zagadnień instrumentacji na potrzeby analizy do celów diagnostyki medycznej, np. jakiś głównych etapów rozwoju i obecnych tendencji w rozwoju tej instrumentacji, biorąc pod uwagę, że jest to praca z pogranicza chemii analitycznej i diagnostyki klinicznej. Następujący z kolei opis urządzeń mikrosolenoidowych stosowanych przez Autora do konstrukcji własnych układów pomiarowych poprzedzony jest dość krótkim wprowadzeniem do analizy przepływowej, jako szczególnej metodologii prowadzenia pomiarów analitycznych. Przepływowe układy, określane jako układy multikomutacyjne, konstruowane są od ok. 20 lat, głównie na potrzeby analizy środowiskowej, analizy żywności i farmaceutyków. Autor szczegółowo przedstawia też kilka takich układów opisanych w literaturze do oznaczeń klinicznych, dobrze pokazując zarówno zalety takich układów pomiarowych, jak i ich złożoność. Tą część pracy kończy wprowadzenie do spektroskopowych detekcji z zastosowaniem układów optoelektronicznych. Badania na ten temat zapoczątkowano na Wydziale Chemii Uniwersytetu

Warszawskiego już 30 lat temu, ale to zbyt odległa prehistoria, żeby zasłużyła chociaż na wzmiankę przez Autora. W przedstawieniu zastosowań diod elektroluminescencyjnych LED do detekcji promieniowania brakiem jest pominięcie innych elementów optoelektronicznych stosowanych też do tego celu z odniesieniem np. do prac je porównujących (np. *Anal. Chim. Acta* 500 (2003)337 lub *Talanta* 99 (2012) 730).

Po skrótowym opisie celu badań, prowadzonych w ramach doktoratu, na str.63 następuje wyliczenie urządzeń pomiarowych i komponentów stosowanych do konstrukcji własnych układów przepływowych. Wyjaśnienia wymaga, co to jest i jakiego pochodzenia „KSP Measurement System”, stosowany do kontroli obsługi urządzeń mikrosolenoidowych. W opisie aparatury powinien być też dodany opis instrumentów i szczegółów procedur stosowanych do oznaczeń porównawczych poszczególnych parametrów, wykonywanych w Zakładzie Diagnostyki Laboratoryjnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Pierwszy układ opisany w części doświadczalnej pracy do oznaczeń ALP był wzorowany na typowym układzie FIA opracowanym kilka lat wcześniej przez zespół Prof. Konckiego z takim samym detektorem optoelektronicznym PEDD [199]. Zoptymalizowano konfigurację tego nowego układu, czas prowadzenia reakcji enzymatycznej oraz natężenie prądu zasilającego diodę emitującą w pomiarach z zastosowaniem fosforanu p-nitrofenylu jako substratu reakcji enzymatycznej. Opracowana procedura pomiarowa z różnicowym pomiarem dwupunktowym umożliwiała korekcję tła pochodzącego od zabarwienia samej próbki surowicy przez odpowiedni podział segmentu próbki, wprowadzonej do układu. W zoptymalizowanych warunkach, w zakresie fizjologicznym ALP, precyzja pomiarów była na poziomie RSD 7% - czy to zadowalające i porównywalne z oznaczeniami referencyjnymi (abstrahując od pokazanego wykresu Blanda-Altmana)? Różnice wyników sięgają nawet kilkudziesięciu procent (Rys.44). W tym samym układzie przepływowym, przy zmodyfikowanych warunkach chemicznych, podjęto też próby oznaczania aktywności fosfatazy kwaśnej ACP, lecz nie uzyskano w tym przypadku statystycznie akceptowalnej zbieżności wyników z oznaczeniami referencyjnymi. Przypisano to znacznie mniejszej precyzji oznaczeń aktywności ACP przy jej o rząd wielkości niższych wartościach w porównaniu do ALP, co przypisano nie do końca wyjaśnionym efektem matrycowym, odbijającym się na niedostatecznej stabilności rejestrowanego sygnału linii podstawowej.

Dużo uwagi w części literaturowej poświęcono formom izoenzymatycznym fosfataz alkalicznej i kwaśnej. Czy było to w jakiś sposób brane pod uwagę w planowaniu i ocenie wyników badań własnych? Z ciekawej literaturowej prezentacji zagadnienia wynika, że ma to chyba ważną rolę diagnostyczną. Czy poszczególne izoenzymy mają jakąś specyficzność substratową obok podanej w Tab.3 specyficzności inhibitowania przez aminokwasy i peptydy?

Wytknę też, że nie podobają mi się jako niby-polskie określenia „LED-detektor”, czy „LED-emiter” (str.66), czy też sformułowania „wyliczanie sygnału analitycznego”(str.68), czy „wyliczanie wyniku testu” (str.70), bo te elementy to się raczej oblicza, niż wylicza.

Optymalizację metod oznaczania ALP i ACP kontynuowano w zmienionej konstrukcji układu przepływowego z zastosowaniem wyłącznie urządzeń solenoidowych w funkcjonowaniu całego układu, co pozwoliło na poprawę precyzji oznaczeń oraz wykrywalności ACP w stosunku do układu z zastosowaniem pompy perystaltycznej. Złożoność tego układu pokazuje Rys.53 i to szczególnie dobry przykład inwencji konstrukcyjnej Autora, również w opracowaniu całej procedury i oprogramowaniu komputerowego sterowania całym, wielostopniowym pomiarem. Dużo uwagi poświęcono też optymalizacji konstrukcji detektora optoelektronicznego. Na str.83

znajduje się lakoniczna uwaga o drastycznym spadku „żywności diody emitującej” w pewnych warunkach. Tu aż się prosi o bardziej obszerny komentarz. Trudno się doszukać informacji jaką objętość próbki stosowano w zoptymalizowanym układzie (8 μ L – str.76?). W analizie rzeczywistych próbek krwi otrzymano znacznie lepszą zgodność wyników z oznaczeniami referencyjnymi zarówno dla ALP, jak i szczególnie dla ACP, w porównaniu do wcześniej opisanego układu. To nowatorski, bardzo oryginalnie zaprojektowany układ przepływowy do jednoczesnych oznaczeń aktywności obu enzymów. Szkoda tylko, że Autor nie pokusił się o próbę przekonania czytelnika o tym, jaka może być jego przewaga w stosunku do licznych handlowych analizatorów klinicznych.

Z kolei opisano konstrukcję i optymalizację funkcjonowania dwóch układów do oznaczeń kinetycznych kreatyniny (nie uważam za właściwe określenie „reakcja kinetyczna” str.91). W bardziej złożonym układzie możliwe jest prowadzenie oznaczeń zarówno w próbkach moczu, jak i krwi, a 100-krotne rozcieńczenie próbki eliminuje praktycznie wpływ interferencji. (I tu znowu wytknę trudne do zaakceptowania określenie - „parametry linii trendu” na str. 94, bo to jednak też powinno być recenzentem). Uzyskane wartości współczynnika korelacji 0.98 – 0.99 dla wyników oznaczeń w porównaniu do wartości uzyskanych w pomiarach przy użyciu analizatora Roche Cobas 6000 dla próbek moczu i surowicy krwi pokazują bardzo dobrą ich zgodność.

Ostatnia część badań mgr K. Strzelaka w ramach doktoratu dotyczyła konstrukcji układów przepływowych do oznaczeń strąceniowych białek z zastosowaniem optoelektronicznych detektorów PEDD z detekcją światła rozproszonego metodą turbidymetryczną i nefelometryczną. Zastosowanie detekcji turbidymetrycznej z diodami LED jako źródłem światła w układach przepływowych pojawiają się już od kilku lat, ale nie stosowano jeszcze do tego celu sprzężonych detektorów PEDD. W optymalizacji doboru diod emitujących i detekcyjnych do obu metod detekcji światła rozproszonego Autor sprawdził 14 diod LED. Największa czułość detekcji turbidymetrycznej i nefelometrycznej wymagała zastosowania diod o zupełnie innych długościach fali (Rys. 69). Diody zastosowane w optymalnej konfiguracji do detekcji turbidymetrycznej nie umożliwiają uzyskania wręcz żadnego sygnału w przypadku detekcji nefelometrycznej i odwrotnie. Niestety obserwacja ta nie jest w żaden sposób skomentowana, a to chyba bardzo ciekawe. Geometrię detektorów oraz wielkość prądu zasilającego badano na przykładzie oznaczeń albuminy wołowej z zastosowaniem kwasu sulfosalicylowego w typowym układzie FIA. W zoptymalizowanych warunkach przeprowadzono też oznaczenia całkowitego białka w próbkach moczu uzyskując dobrą zgodność wyników obu detekcji z wartościami uzyskanymi przy użyciu rutynowego analizatora klinicznego.

Z kolei podobne oznaczenia prowadzono w układzie przepływowym, skonstruowanym z zaworów i pomp solenoidowych i po zoptymalizowaniu parametrów pracy układu przeprowadzono oznaczenia całkowitej zawartości białek w próbkach płynu mózgowo-rdzeniowego, uzyskując równie dobrą zgodność wyników oznaczeń z oznaczeniami referencyjnymi.

Kolejnym krokiem, szczególnie istotnym w diagnostyce białkomoczu, było skonstruowanie układu z elementami solenoidowymi i dwoma detektorami PEDD do jednoczesnych oznaczeń kreatyniny i białka całkowitego. Obok układu do jednoczesnych oznaczeń aktywności dwóch fosfataz ALP i ACP, uważam to za najbardziej wartościowe i oryginalne osiągnięcie doktoranta. Dokonane tu na 13 rzeczywistych próbkach statystyczne porównanie wyników z oznaczeniami referencyjnymi, wygląda tu jednak nieco mniej zadowalająco, szczególnie w przypadku próbek z zakresu stężeń patologicznych, ale na podstawie szeroko stosowanych testów statystycznych uznane zostało przez Autora za akceptowalne.

Ostatnim układem, którego konstrukcję Autor opisał jest mikrosolenoidowy układ do immunochemicznych oznaczeń strąceniowych albuminy. Zastosowano do tego celu detekcję nefelometryczną, która umożliwiała uzyskanie niższej granicy wykrywalności, niż detekcja turbidymetryczna. Optymalizacja parametrów funkcjonalnych obejmowała szczególnie dużą liczbę parametrów – stężenia odczynników, objętości, czas trwania poszczególnych etapów procedury. Rys. 93 stanowi doskonałą ilustrację złożoności takiego oznaczenia, wynikającej z przebiegu krzywej strąceniowej Heidelberga i zasadność mechanizacji takich oznaczeń. Wyniki oznaczeń albuminy w próbkach moczu dały bardzo dobrą zgodność z oznaczeniami referencyjnymi. Szkoda, że szczególnie w tym przypadku Autor nie porównał nieco obszerniej opracowanej metody z prowadzeniem takich oznaczeń w stosowanych obecnie instrumentach do analiz rutynowych, czy też oznaczeniami manualnymi ciągle wykonywanymi w laboratoriach diagnostycznych pod względem czasu ich wykonania, czy zużycia odczynników.

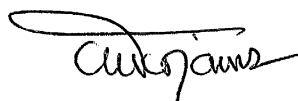
Konkludując - przedstawioną pracę doktorską oceniam bardzo wysoko. Na tą ocenę składa się bardzo duża inwencja Autora w konstrukcji układów pomiarowych, bardzo trafny wybór różnorodnych analitów, bardzo wszechstronna optymalizacja układów oraz dogłębna analiza statystyczna uzyskanych wyników. Mimo zebrania bardzo obszernego materiału eksperymentalnego praca nie jest przesadnie obszerna, co jest pewnie zasługą osiągniętej już przez Autora wprawy w przygotowaniu materiałów do opublikowania. Praca przygotowana jest edytorsko i technicznie na niezwykle wysokim poziomie, co stwierdzam w porównaniu z kilkudziesięcioma innymi rozprawami doktorskimi z uczelni krajowych i zagranicznych, które miałem okazję recenzować. Dotyczy to układu tekstu, przygotowania schematów aparaturowych i wykresów przedstawiających zebrane dane eksperymentalne. Do rzadkości należą potknięcia typograficzne, przeoczone w korekcie. Przy ogólne poprawnym języku, którym napisana jest cała praca, Autor mógłby sobie darować użycie kilku już wytkniętych określeń, ale też i takich, jak „punkt tyczy się” (str.10), czy „trend rozwoju” (str.19).

Osiągnięcia publikacyjne Autora rozprawy, na tym etapie rozwoju młodego naukowca, są w mojej opinii wybitne. To przede wszystkim 8 współautorskich prac opublikowanych w bardzo wysoko cenionych międzynarodowych czasopismach analitycznych *Analyst* (Royal Chemical Society) oraz *Talanta* i *Analytica Chimica Acta* (obydwa Elsevier), o wartości IF od 3,5 do 4,5. To oprócz tego również jest multimedialna prezentacja zamieszczona w *Analytica Chimica Acta* oraz dwa rozdziały w książkowych pracach zbiorowych, wydanych w kraju po polsku. Prace opublikowane w latach 2009-2015 w czasopismach były już 40 razy cytowane przez innych autorów, co bardzo dobrze pokazuje ich rezonans w środowisku analityków. W połowie z tych opublikowanych prac mgr K. Strzelak jest pierwszym autorem.

Uważam, że praca doktorska mgr Kamila Strzelaka spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim w polskim prawodawstwie i wnoszę o dopuszczenie mgr K. Strzelaka do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.

Wnoszę też o wyróżnienie rozprawy, czego uzasadnienie zawarłem w odrębnym wniosku.

10 listopada 2015



Prof. dr hab. Marek Trojanowicz
Instytut Chemii i Techniki Jądrowej
Laboratorium Jądrowych Technik Analitycznych
ul. Dorodna 16, 03-185 Warszawa
Tel: (22) 554 1030,
trojan@chem.uw.edu.pl

Wniosek o wyróżnienie

pracy doktorskiej **mgr Kamila Strzelaka** zatytułowanej „*Mikrosoleniowodowe przepływowe systemy bioanalityczne do oznaczania wybranych analitów istotnych w diagnostyce medycznej*” wykonanej w ramach Międzywydziałowych Interdyscyplinarnych Studiów Doktoranckich w zakresie nauk Matematyczno-Przyrodniczych Uniwersytetu Warszawskiego

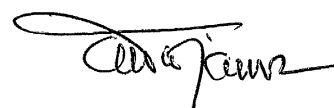
Po szczegółowym zapoznaniu się z pracą, konfrontacją jej z bieżącym stanem badań w tej dziedzinie i osiągnięć konstrukcyjnych w tym zakresie, oraz zapoznaniem się z rezonansem tych prac w literaturze światowej, wnoszę o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr Kamila Strzelaka.

Praca zawiera opracowania konstrukcyjne szeregu unikalnych układów przepływowych i optymalizację ich parametrów funkcjonalnych do prowadzenia oznaczeń wybranych analitów, bardzo szeroko wykorzystywanych w diagnostyce medycznej. Jest to praca dotycząca bardzo aktualnej tematyki na tle tendencji rozwojowych współczesnej chemii analitycznej i bardzo ważna z punktu widzenia obszaru potencjalnych praktycznych zastosowań o dużej randze społecznej.

Głównymi zaletami opracowanych układów jest wykorzystanie elementów optoelektronicznych do konstrukcji urządzeń detekcyjnych oraz opracowanie koncepcji układów pomiarowych, które mają właściwości prototypów do komercjalizacji. Przyjęte koncepcje konstrukcji otwierają drogę do dalszej miniaturyzacji do skali mikroukładów przepływowych przez dalszą integrację układów i zastosowanie dostępnych mikroukładów elektromechanicznych o jeszcze mniejszej skali.

Szczególnym potwierdzeniem elementów nowości naukowej, wartości przeprowadzonych badań i oryginalności przyjętych koncepcji oraz opracowanych metodologii pomiarowych, jest przyjęcie publikacji przygotowanych z wyników przeprowadzonych badań przez międzynarodowe czasopisma analityczne o najwyższej reputacji w skali światowej. Wynikiem tego jest 8 bardzo wartościowych publikacji i 2 rozdziały w zbiorowych opracowaniach książkowych. Jestem przekonany, że osiągnięte wyniki badań stanowią podstawę wyróżnienia przygotowanej rozprawy.

10 listopada 2015





Prof. dr hab. inż. Elżbieta Malinowska
tel.: 22-234-5657; fax: 022-234-5631, E-mail: ejmal@ch.pw.edu.pl

Warszawa 2016-01-02

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr Kamila Strzelaka
pt: „*Mikrosolenoidowe przepływowe systemy bioanalityczne do oznaczania wybranych analitów istotnych w diagnostyce medycznej*”

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Kamila Strzelaka pt. „*Mikrosolenoidowe przepływowe systemy bioanalityczne do oznaczania wybranych analitów istotnych w diagnostyce medycznej*” wykonana została pod kierunkiem prof. dr hab. med. Dagny Bobilewicz i prof. dr hab. Roberta Konckiego w Pracowni Teoretycznych Podstaw Chemii Analitycznej.

Opracowanie czułych, selektywnych, stosunkowo niedrogich, a jednocześnie niezawodnych metod analitycznych pozwalających na wykrywanie i/lub oznaczanie różnorodnych markerów chorobowych w złożonych próbkach fizjologicznych to tematyka niezwykle ważna wobec rozprzestrzeniających się chorób cywilizacyjnych. Szybkie badania/testy daje szansę na zidentyfikowanie grupy pacjentów, którzy poddawani są następnie bardziej szczegółowym badaniom mającym na celu potwierdzenie (lub wykluczenie) występowania danego zespołu chorobowego i stanu jego zaawansowania. Niezwykle cennym rozwiązaniem, pozwalającym nie tylko na zminimalizowanie ilości badanego materiału, przyspieszenie procedury analitycznej, jak również minimalizację błędów, jest zastosowanie zautomatyzowanych układów przepływowych. Powstawaniu nowoczesnych dedykowanych (bio)analizatorów sprzyja zarówno pojawianie się na rynku nowych materiałów i technologii, jak również pełniejsza wiedza na temat procesów zachodzących w organizmach żywych, przyczyn i mechanizmów powstawania stanów chorobowych oraz ich leczenia. Zatem zagadnienia podjęte w recenzowanej pracy są w dalszym ciągu aktualne.

W dalszej części recenzji przedstawię moje uwagi dotyczące zarówno strony redakcyjnej, jak i wartości merytorycznej pracy doktorskiej.

Strona redakcyjna

Niniejsza rozprawa składa się z 11 rozdziałów, których pierwsze cztery stanowią przegląd literaturowy, w 5-tym doktorant podaje cel i plan badań, w 6-tym odnaleźć można informacje dotyczące aparatury, akcesoriów i odczynników wykorzystywanych w badaniach. W kolejnych rozdziałach (7-9) poświęcone są poszczególnym projektom realizowanym w ramach pracy doktorskiej. Przedstawiony do recenzji manuskrypt zamyka podsumowanie i spis cytowanej literatury. Całość została przedstawiona na 140 stronach tekstu ilustrowanego licznymi rysunkami (94) i tabelami (25).

Na wyróżnienie zasługuje niebywale staranna szata graficzna i edytorska poprawność recenzowanej rozprawy. Autor nie ustrzegł się pewnych niedopowiedzeń oraz „literówek”, ale nie warto ich tutaj przytaczać, gdyż nie mają istotnego wpływu na wartość pracy.

Wartość merytoryczna i użytkowa

We wstępie Doktorant wprowadza czytającego w obszar tematyczny, którego dotyczy rozprawa, a następnie przechodzi do zaprezentowania przeglądu literaturowego dotyczącego zagadnień, nad którymi koncentrował się przy wykonywaniu doktoratu. Doktorant przedstawia wybrane markery biochemiczne umożliwiające rozpoznanie choroby i/lub jej monitorowanie oraz techniki analityczne do tych celów stosowane, a następnie przechodzi do omówienia elementów układów przepływowych, jakimi są mikrosolenoidowe pompy i zawory membranowe oraz układy detekcyjne w postaci diod elektroluminescencyjnych oraz optoelektronicznych detektorów typu PEDD. Dzięki szerokiej analizie tematu, Autor udostępnił czytającemu bardzo dobre merytorycznie (oparte na solidnej podbudowie 216 pozycji literaturowych), a jednocześnie przedstawione w syntetycznej formie, omówienie zagadnień bezpośrednio związanych z planowanymi badaniami. Wykazał się także dużą umiejętnością analitycznej oceny cytowanych prac.

Na stronie 63 Doktorant sformułował główne cele pracy i sposoby ich realizacji. Sformułowania tam zawarte wskazują na to, że za główny cel mgr Strzelak postawił sobie połączenie nowoczesnych rozwiązań układów przepływowych wyposażonych w odpowiednie systemy detekcyjne ze znanymi i od dawna wykorzystywanymi reakcjami biochemicznymi by opracować innowacyjne urządzenia, które stanowiłyby (cytuję) *„swoistą odpowiedź na pojawiające się problemy analityczne”, tj.: „konieczność przeprowadzenia pomiarów kinetycznych (ALP), bardzo niska aktywność enzymatyczna (ACP), potrzeba przeprowadzenia pomiaru dyskryminacyjnego (kreatynina), przeprowadzenie pomiarów precypitacyjnych (białko całkowite), czy też potrzeba przeprowadzenia pomiarów immunochemicznych (albumina).”*

W następnych rozdziałach (7-9) Doktorant przechodzi do przedstawienia wyników własnych. W rozdziałach tych znajdujemy opis otrzymanych wyników i ich interpretację. Każdy z tych rozdziałów poświęcony jest określonemu bioanalitowi i ma podobny układ, obejmujący pełną informację począwszy od założeń proponowanej metodyki, opisu procedur wykonawczych i układów pomiarowych, poprzez wyniki analiz próbek, na podsumowaniu i dyskusji kończąc. Układ tych rozdziałów jest logiczny, dobrze ilustruje kolejne etapy pracy, a liczne tabele i rysunki pozwalają na skonfrontowanie uzyskanych wyników z opisem podanym przez Doktoranta.

Pierwszy z nich, najobszerniejszy dotyczy opracowania układu do oznaczania aktywności fosfatazy zasadowej oraz fosfatazy kwaśnej. Doktorant pokazał, bazując na korelacji danych uzyskanych proponowaną metodą i metodą referencyjną dla analizy próbek surowicy krwi, że w wyniku przeprowadzenia optymalizacji działa zaproponowanego systemu możliwe jest jego zastosowanie do analizy klinicznej fosfatazy zasadowej. W przypadku fosfatazy kwasowej analiza statystyczna wskazała, że (cytuję) „oznaczanie aktywności ACP za pomocą opisywanego systemu nie było możliwe”. Bardzo ważne i godne podkreślenia jest to, że mgr Strzelak nie poprzestał na tym stwierdzeniu, ale jako młody dociekliwy naukowiec podjął się analizy źródeł błędów i (moim zdaniem) zdefiniował je właściwie. Kolejnym krokiem było opracowanie takiego systemu, w którym zminimalizowane zostałyby wady poprzedniego, a w szczególności poprawiona została powtarzalność i zwiększona czułość oznaczeń fosfatazy kwaśnej. Doktorant pokazał, że poprzez zastosowanie mikrosolenoidowych urządzeń do sterowania przepływem oraz przemyślane zaprojektowanie odpowiednich modułów gwarantujących przebieg poszczególnych etapów procedury we właściwych warunkach można opracować urządzenie do jednoczesnego oznaczania aktywności ALP i ACP.

W rozdziale 8 Doktorant omówił prace związane z opracowaniem zautomatyzowanego układu dedykowanego oznaczaniu kreatyniny w próbkach klinicznych. I tu, po starannej optymalizacji parametrów udało się zbudować system przydatny do rutynowej analizy klinicznej.

Za szczególnie interesujące i oryginalne uważam wyniki zaprezentowane w rozdziale 9. Doktorant zaproponował i zbadał możliwość użycia w systemach przepływowych detektorów typu PEDD do detekcji układów koloidalnych, w trybie pomiarów turbidymetrycznych i nefelometrycznych. Docelowo opracował proste urządzenia typu FIA do oznaczeń białka całkowitego w próbkach moczu, jak również multikomutacyjny układ, uwzględniający specyfikę i wielkość próbek, do badania zawartości białka całkowitego w próbkach płynu mózgowo-rdzeniowego. Kolejny projekt to multikomutacyjny układ przepływowy do jednoczesnego oznaczania stężenia białka całkowitego i kreatyniny. W tym przypadku Doktorant ponownie pokazał, że zdobyta wiedza i doświadczenie pozwala mu na swobodne,

ale jednocześnie uwzględniające specyfikę pomiarów klinicznych, obiektów badań i zachodzących reakcji, projektowanie poszczególnych modułów i składanie ich w pełni użyteczne urządzenie analityczne. Kulminacją prac przedstawionych w recenzowanej pracy doktorskiej jest urządzenie opisane w rozdziale 9.4, stanowiące system analityczny do oznaczania wybranej frakcji białka metodą immunochemiczną z wykorzystaniem pomiarów immunoprecypitacyjnych. Opracowany układ mikrosolenoidowy zapewniał zmechanizowaną procedurę uwzględniającą mały pobór zarówno próbki, jak i roztworu przeciwciał.

Również rozdział 10 „Podsumowanie” świadczy o dużej dojrzałości Autora i jest prawdziwym zwięzłym podsumowaniem, w którym nie pojawiają się powtórzenia z dyskusji wyników zamieszczonych na zakończenie opisu poszczególnych projektów, ale Doktorant pokazuje swój sposób myślenia i podejście do rozwiązywania problemów analitycznych, wynikających ze specyfiki badanych analitów, a przedstawiając każdy z sześciu opracowanych systemów analitycznych, umiejętnie podkreśla elementy nowości naukowej tam występujące.

Doktorant podjął się trudnego zadania badawczego i wywiązał się z niego znakomicie. Recenzowana rozprawa doktorska zawiera bez wątpienia elementy nowości naukowej, a otrzymane przez doktoranta wyniki dowodzą praktycznych/aplikacyjnych walorów tej pracy, co jest godne podkreślenia. Sposób planowania i przeprowadzenia badań oraz końcowe efekty pracy oceniam wysoko. Za najważniejsze elementy rozprawy uważam:

- wykazanie elastyczności rozwiązań dotyczących urządzeń analitycznych wykorzystujących mikrosolenoidowe zawory i pompy;
- zaprezentowanie możliwości tworzenia modułów spełniających określone funkcje w procedurze analitycznej (moduł do przygotowania roztworu substratu reakcji enzymatycznej, moduł wprowadzania małych objętości próbki i/lub reagenta z uwzględnieniem różnic w gęstościach, moduł reakcyjny, moduł do rozcieńczenia próbki w trakcie analizy, moduł detekcyjny);
- wprowadzenie detektorów PEDD do pomiarów turbidymetrycznych i nefelometrycznych;
- opracowanie sześciu różnych systemów analitycznych o dużym potencjale aplikacyjnym do rutynowych analiz klinicznych.

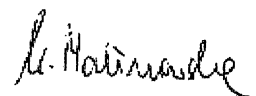
Jakość przedstawionych wyników jest tak wysoka, że nie mam żadnych istotnych merytorycznych uwag do pracy. Natomiast poproszę o podanie definicji pojęcia „walidacja” oraz wskazanie jaka metoda walidacyjna, według jakiego protokołu i w odniesieniu do jakich parametrów została wybrana przez Doktoranta, jako że na str. 71, 84, 106 i 129 jest mowa o walidacji systemu bez podania powyższych informacji. Ponadto, biorąc pod uwagę różną liczbę analizowanych próbek rzeczywistych w poszczególnych projektach, nasuwa się pytanie - od czego zależała ich liczba i czy było to istotne dla procedury walidacyjnej?

Na podkreślenie zasługuje obiektywność oceny wyników doświadczalnych otrzymanych i opisanych przez Autora (nie tak często spotykana w pracach młodych naukowców). Wyniki badań będących przedmiotem dysertacji stały się podstawą 8 publikacji, które ukazały się w bardzo dobrych analitycznych czasopismach naukowych posiadających współczynnik wpływu impact factor (IF) i znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR) - 4 artykuły ukazały się w czasopiśmie *Talanta* (IF₂₀₁₄ 3,604), 3 w *Analytica Chimica Acta* (IF₂₀₁₄ 4,289) oraz 1 w *Analyst* (IF₂₀₁₄ 4,107). Potwierdza to dodatkowo aktualność i atrakcyjność tematyki badań.

Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Kamila Strzelaka spełnia z nawiązką warunki stawiane rozprawom doktorskim przez Ustawę o stopniach naukowych i tytule naukowym w zakresie sztuki z dn. 14 marca 2003 roku wraz z późniejszymi poprawkami podanymi w Ustawie "Prawo o szkolnictwie wyższym" i wnioskuję do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie Doktoranta do publicznej dyskusji nad rozprawą.

Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr Kamila Strzelaka. Uzasadnienie przedstawiam w osobnym dokumencie.

Z poważaniem,





Prof. dr hab. inż. Elżbieta Malinowska
tel.: 22-234-5657; fax: 022-234-5631, E-mail: ejmal@ch.pw.edu.pl

Warszawa 2016-01-02

Uzasadnienie wniosku o wyróżnienie

Dysertacja mgr Kamila Strzelaka pt: „*Mikrosolenoidowe przepływowe systemy bioanalityczne do oznaczania wybranych analitów istotnych w diagnostyce medycznej*” jest napisana bardzo starannie pod względem merytorycznym i edytorskim. Część literaturowa oparta jest na solidnej podbudowie starannie wybranych 216 pozycji literaturowych. Dzięki szerokiej analizie tematu, Autor udostępnił czytającemu bardzo dobre, a jednocześnie przedstawione w syntetycznej formie omówienie zagadnień bezpośrednio związanych z planowanymi badaniami. Wykazał się także dużą umiejętnością analitycznej oceny cytowanych prac.

W części doświadczalnej Doktorant w pełni udowodnił dojrzałość w planowaniu i realizacji badań, a także umiejętność dogłębnej analizy i krytycznej oceny uzyskanych wyników. Efektem badań jest opracowanie sześciu różnych systemów analitycznych o dużym potencjale aplikacyjnym w rutynowych analizach klinicznych płynów fizjologicznych, ukierunkowanych na wykrywanie/oznaczania bioanalitów – markerów chorobowych. Rezultaty tych prac są bardzo dobrze przedstawione, zinterpretowane i poparte rzetelną analizą statystyczną.

Wyniki badań będących przedmiotem omawianej pracy doktorskiej stały się podstawą 8 publikacji, które ukazały się w bardzo dobrych analitycznych czasopiśmie naukowych - 4 artykuły w czasopiśmie *Talanta* (IF₂₀₁₄ 3,604), 3 w *Analytica Chimica Acta* (IF₂₀₁₄ 4,289) oraz 1 w *Analyst* (IF₂₀₁₄ 4,107), co w pełni potwierdza aktualność i atrakcyjność tematyki badań. Sumaryczny IF₂₀₁₄ tych prac jest bardzo wysoki i wynosi **31,39**. Pan mgr Kamil Strzelak jest pierwszym autorem w 5 publikacjach, natomiast w 2 z nich pełni funkcję „autora korespondującego”. Ten ostatni fakt zasługuje na wyraźne podkreślenie, gdyż należy to rzadkości w publikacjach związanych z wykonywaną pracą doktorską. Poza tym w jego dorobku są 3 inne publikacje, w tym jedna w czasopiśmie *Analytica Chimica Acta*.

Powyższa ocena składa się na ocenę mgr Kamila Strzelaka, jako młodego naukowca znakomicie przygotowanego do kontynuowania pracy badawczej.

Biorąc powyższe pod uwagę, wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego o **wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Kamila Strzelaka** zatytułowanej: „*Mikrosolenoidowe przepływowe systemy bioanalityczne do oznaczania wybranych analitów istotnych w diagnostyce medycznej*”.

Z poważaniem,