



Warszawa, 7 lutego 2022

Recenzja rozprawy doktorskiej
Pani mgr Natalii Rybkowskiej - Kucharczyk

pt.:

wykonanej pod opieką prof. dr. hab. Roberta Konckiego oraz dra Kamila Strzelaka
w Zakładzie Chemii Nieorganicznej i Analitycznej,
na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego

Pani mgr Natalia Rybkowska - Kucharczyk ukończyła studia licencjackie i magisterskie na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, broniąc stosowne prace z obszaru przepływowych systemów analitycznych. Następnie, podążając w kierunku swoich zainteresowań, ukończyła studia podyplomowe związane szeroko rozumianą kryminalistyką w Centrum Nauk Sądowych UW. Od 2015r realizuje program studiów doktoranckich na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego na kierunku Chemia specjalizując się w Chemii Nieorganicznej i Analitycznej. Efektem jej badań prowadzonych w latach 2015-2021 jest przedłożona do recenzji rozprawa doktorska pt.: **“Optoelektroniczne detektory fotometryczne do oznaczania jonów żelaza w przepływowych systemach analitycznych”**, wykonana pod opieką prof. dra. hab. Roberta Konckiego oraz dra. Kamila Strzelaka, obejmująca dorobek naukowy, na który składają się trzy opublikowane artykuły naukowe w renomowanych czasopismach międzynarodowych oraz jeden rozdział w anglojęzycznej monografii naukowej pod redakcją prof. Pawła Kościelniaka. W dwóch publikacjach Doktorantka jest pierwszą autorką, co wskazuje na jej wiodący udział w powstawaniu tych prac. Ponadto, w dorobku naukowym Doktorantki znajduje się 10 wystąpień na krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych. W czasie studiów doktoranckich Pani Rybkowska - Kucharczyk brała udział w realizacji dwóch projektów badawczych, odbyła także praktykę w Zakładzie Ceramiki Instytutu Technologii Materiałów Elektronicznych w Warszawie.

Recenzowana praca doktorska dotyczy opracowania konstrukcji optoelektronicznych detektorów fotometrycznych typu PEDD (*Paired Emitter Detector Diode*) przeznaczonych do oznaczania jonów żelaza z wykorzystaniem znanych odczynników analitycznych takich jak: 1,10-fenantrolina, ferren s i ferrozyna oraz weryfikacji ich analitycznej przydatności w badaniach

preparatów farmaceutycznych, analizie próbek surowicy krwi i określaniu parametrów metabolizmu żelaza.

Rozprawa doktorska Pani Natalii Rybkowskiej - Kucharczyk podzielona jest na 13 rozdziałów i obejmuje 131 stron. Po jednostronicowym wprowadzeniu czytelnika w obszar dysertacji, Doktorantka w 36 stronicowej części literaturowej, opierającej się o 204 cytowane pozycje literaturowe, charakteryzuje żelazo – jako analit, któremu poświęcona jest główna część eksperymentalna recenzowanej pracy. Doktorantka omawia także najważniejsze metody oznaczania tego analitu, charakteryzuje optyczne układy detekcyjne oraz, omawiając techniki przepływowe, podkreśla zalety urządzeń mikrosolenoidowych. Ten fragment pracy napisany jest w sposób zwięzły, zrozumiały, a ilustracja graficzna omawianych reakcji, konstrukcji oraz zestawienia tabelaryczne są na wysokim poziomie. Jednak, z racji pełnionej funkcji recenzenta, wskazać muszę kilka błędów i niedociągnięć, których w tej części rozprawy nie udało się uniknąć Doktorantce. I tak na str. 7 (potem także w wielu miejscach pracy) Doktorantka moim zdaniem trochę niefortunnie mówi o „mechanizacji” nowoczesnych układów pomiarowych i analitycznych. Czytelnikowi, szczególnie starszemu (a do takich chyba już niestety mogę siebie zaliczyć), mechanizacja kojarzy się raczej z zamierzczłym hasłem związanym z mechanizacją rolnictwa.... Doktorantka na str. 8 pisze o diagnostyce żelaza zamiast o badaniu poziomu tego analitu i jego form w organizmie pacjenta, na str. 23 stwierdza że rolę „wzmacniacza rozproszonego sygnału optycznego” mogą pełnić polimerowe nanosfery, co raczej wydaje niefortunnym tłumaczeniem z jęz. angielskiego. Na str. 25 zapis reakcji tworzenia kompleksu tiocyjanianowego żelaza jest błędny, co na tym etapie kształcenia, chemikowi analitykowi po prostu nie przystoi...podobnie jak zestaw dwóch „równań” reakcji ze strony 33, który mógłbym określić mianem bałaganu ligandowo-ładunkowego. Na str. 26 na wykresie przedstawiającym widmo absorpcji tego kompleksy pojawiają się w opisie osi jednostki umowne absorbancji, która z definicji jest bezwymiarowa.

Omawiając technikę AAS, także szeroko stosowaną do oznaczania żelaza, Doktorantka pisze, że analityczną długością fali dla żelaza jest linia 232,036nm – czy zawsze ta linia musi być linią analityczną? Od czego zależy wybór linii widmowej w AAS nawet w oznaczaniu tego samego pierwiastka? Na str.38 pojawia się szereg niejasnych i niefortunnych stwierdzeń dotyczących fotodiod, fotorezystorów i fototranzystorów m.in. że: „charakteryzują się krótkim lub nieco dłuższym czasem”, „wąskim zakresem odpowiedzi”, są „szeroko stosowanie”, bądź wykorzystywane „w niewielkim stopniu...” Na rys. 17 str. 44 niejasna i niewyjaśniona przez Doktorantkę jest rola „spirali wprowadzającej”. Ponadto, omawiając konstrukcje mikrosolenoidowe zaworów i pomp, nie pisze ani słowa o żadnych innych konstrukcjach, które mogłyby zapewnić przepływ roztworów lub zmienić kierunek ich przepływu w układach typu FIA, tak jakby te urządzenie jeszcze nie zostały opracowane, a przecież rynek nasycony jest najróżniejszymi konstrukcjami pomp i zaworów o bardzo dużym spektrum zastosowań. Dlatego np. w tabeli 6 na str. 46 mogłaby się znaleźć

informacja jakie urządzenia zostały wykorzystane przez inne grupy badawcze do generowania przepływu w układach wymienionych układach do oznaczania żelaza. Mógłby tam pojawić się również krytyczny komentarz Doktorantki mówiący o wadach, bądź zaletach wspomnianych rozwiązań.

W dalszej części pracy (po wprowadzeniu literaturowym) powinno, moim zdaniem, znaleźć się choćby szczątkowe podsumowanie, z którego wynikałyby cele i tezy przygotowywanej rozprawy podkreślające elementy nowości naukowych w obszarze prowadzonych badań i opracowywanych przez Doktorantkę konstrukcji optycznych układów detekcyjnych. Niestety takiego rozdziału w recenzowanej pracy nie znalazłem, natomiast **cel pracy i plan badań Doktorantka ujęła w jednym zdaniu, które jednocześnie stanowi rozdział 6 dysertacji**. W związku z tym na publicznej obronie tej rozprawy oczekiwałbym od Pani Natalii Rybkowskiej-Kucharczyk wyraźnego sformułowania, przede wszystkim, tez swojej rozprawy oraz określenia najważniejszych elementów nowości naukowej, które zawiera praca. Będzie to znaczącym ułatwieniem dla członków Komisji w podjęciu decyzji o dopuszczeniu Kandydatki do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Kolejna część rozprawy Pani Natalii Rybkowskiej - Kucharczyk to **rozdział-spis materiałów**, aparatury, odczynników i niezbędnych akcesoriów wykorzystanych przez Doktorantkę w badaniach, po którym następuje, dość **chronologiczne i przypominające nieco pamiętnik naukowy Doktorantki**, omówienie przeprowadzonych badań składających się na rozprawę doktorską.

I tak w **badaniach wstępnych**, Pani Kucharczyk – Rybkowska sprawdza cztery główne efekty (reduktora, stężenia buforu i obecności surowicy) mogące mieć wpływ na parametry opracowywanych metod analitycznych, poprzedzając je rejestracją widm stosowanych odczynników kompleksujących żelazo (tylko dlaczego w zakresie 400-700 nm?, jeśli widać że maksima absorpcji dla ferrenu s i ferrozyny przypadają na zakres widmowy poniżej 400 nm) oraz widm roztworów zawierających kompleksy żelaza (stężenia 10-60 $\mu\text{mol/l}$) ze stosowanymi odczynnikami, pozostawiając bez komentarza np. obszar widma 400-500nm , w którym. dla **ferrenu s absorbanca roztworów miała wartość ujemną, podobnie jest na rys. 27 przedstawiającym widma kompleksów żelaza z 1,10-fenantroliną w różnym pH zawierających syntetyczną surowicę** – z czego to mogło wynikać? Mówiąc o liniowości wyznaczonych krzywych wzorcowych oraz o najniższej czułości dla metody wykorzystującej 1,10-fenantrolinę, Doktorantka nie opiera się niestety na żadnej wyznaczonej wartości liczbowej. Porównując szybkość tworzenia kompleksów żelaza z ferrenem s w różnym pH i w obecności różnych reduktorów, Pani Kucharczyk – Rybkowska pisze o **złożoności procesów wpływających na wartość rejestrowanej absorbancji** – takie stwierdzenie wymaga moim zdaniem nieco szerszego komentarza...Podsumowując ten fragment badań, w tabeli 8 str. 61 Doktorantka zestawia najważniejsze parametry testowanych metod oznaczania żelaza – zakres liniowości,

czułość, molowy współczynnik absorpcji, koszt odczynnika kompleksującego oraz optymalne stężenie (niestety nie wiadomo czego...) Zarówno czułość jak i molowy współczynnik absorpcji podane są w niewłaściwych jednostkach – błędnie zawierają jednostkę umowną absorbancji.

Rozdział 9 przedłożonej do recenzji pracy przedstawia wyniki żmudnych pomiarów mających na celu wybór par diód – emiter - detektor oraz wyznaczeniu optymalnych wartości prądu zasilania pozwalających uzyskać najwyższy sygnał analityczny. **Problem w tym, że Doktorantka nigdzie tego sygnału w pracy nie definiuje, raz podaje go jako różnicę sygnału pomiędzy roztworem niezawierającym barwnego kompleksu żelaza, innym razem podaje bezwzględną wartość tego sygnału, jednak zawsze wartość tego sygnału rośnie wraz ze wzrostem stężenia analitu w próbce, bądź w roztworach wzorcowych – z czego to wynika?** Logicznie rozumując, sygnał mierzony na diodzie będącej detektorem powinien przecież mieć najwyższą wartość dla roztworów niezawierających barwnych kompleksów żelaza (brak indywidualnych absorbujących promieniowanie w danym zakresie widmowym), i maleć wraz ze wzrostem stężenia kompleksów ponieważ wówczas do detektora dociera mniej światła z określonego przedziału widmowego. Na obronie doktorskiej prosiłbym o wyjaśnienie tej kwestii. Podobnie jak i kwestii liniowości odpowiedzi diod detekcyjnych – z jakiego zjawiska ona wynika? **Czy oświetlając diody detekcyjne światłem o różnym natężeniu emitowanym przez wybrane diody-emitory uzyskiwać będziemy sygnał liniowy? Jeśli tak to z jakiego zjawiska w materiale półprzewodnikowym ta liniowość wynika?** W klasycznej spektrofotometrii transmitancja nie wykazuje przecież liniowej zależności od stężenia analitu, dopiero absorbancja, będąca logarytmem odwrotności transmitancji, taką zależność wykazuje.... Na stronie 63 Doktorantka pisze o konstrukcji celi pomiarowej opartej o wykorzystanie klocków Lego, którą bez rysunku trudno sobie wyobrazić, w podsumowaniu tego rozdziału na str. 71 przedstawia natomiast 2 schematy opracowanych celek przepływowych o średnicy kanału 3 mm i dł. drogi optycznej 1 cm z czego wynikały tak dobrane wymiary – nie wystarczyło po prostu wykorzystać dostępne na rynku spektrofotometryczne kuwety przepływowe o ponad 3 krotnie mniejszej objętości w strefie detekcji (przy tej samej dł. drogi optycznej) i po przeciwnych stronach umieścić wybrane diody?

Kolejnym etapem prac Doktorantki była konstrukcja i optymalizacja układu przepływowego. Do tej części pracy mam również kilka (moim zdaniem) kluczowych uwag, pomijając językowe:

- optymalizując długość pętli reakcyjnej nigdzie nie podano jej objętości,
- nigdzie w pracy nie znalazłem średnic stosowanych wężyków - co ma przecież zasadnicze znaczenie przy wyznaczaniu całkowitej objętości konstruowanych układów przepływowych,
- a co najdziwniejsze! w podrozdziale poświęconym optymalizacji szybkości przepływu w układzie nie znalazłem ani jednej wartości przepływu roztworów lub próbek, ba! w całej pracy nie ma ani jednej wartości przepływu podanej w klasycznych jednostkach np. ml/min. Na jakiej podstawie Doktorantka twierdzi zatem, że opracowywane systemy przepływowe są

"EKO" w porównaniu z innymi, jeśli nie wie jaka objętość roztworów i w jakim czasie przez nie płynie...

- dlaczego wyznaczone krzywe wzorcowe na rys. 37,38,39,40, nie mają charakteru liniowego w zakresie stężeń 0-100 $\mu\text{mol/l}$ Fe?
- dlaczego jako optymalną wartość prądu zasilającego diodę-emiter dla fenantroliny uznano 23 mA, a dla ferrenu s i ferrozyny 27mA, jeśli wcześniej dla innych wartości np. 31 mA rejestrowano „wyższy” sygnał analityczny?

Rozdział 11 Doktorantka poświęciła przedstawieniu badań związanych z oznaczaniem żelaza w 6 preparatach farmaceutycznych wykorzystując krzywe wzorcowe przedstawione na rys. 47 (z czego wynika ich nieliniowość dla metody wykorzystującej ferrozynę i ferren s?) Czy te same roztwory próbek i wzorców mierzono za pomocą klasycznego spektrofotometru UV-VIS?, czy były inaczej przygotowywane? Doktorantka twierdzi, że wyniki uzyskane „techniką manualną” i w układzie przepływowym są „zadowalająco zgodne” – na jakiej podstawie? Str. 94 – co to znaczy, że system PEDD-MCFA był wykorzystywany jako monitor?, skąd wiadomo że żołądek ma objętość 5L? (taką objętość 0,1M HCl stosowano w badaniu profilu uwalniania Fe z kapsulek suplementów S5 i S6), co w tych badaniach było metodą referencyjną, za pomocą której potwierdzono zgodność wyników?, na podstawie jakiej wartości uznano że te wyniki są zgodne?

Opis procedury oznaczania żelaza w surowicy krwi (rozdział 12) po uwolnieniu go z kompleksu z transferyną w niskim pH i redukcji od jonów o ładunku 2+, i wiązaniu tych jonów przez 3 odczynniki kompleksujące niestety nie jest tożsamy ze schematem umieszczonym na rys. 50, na którym Doktorantka pokazuje pomiar wolnych jonów Fe^{2+} (podobnie na rys54 i 55). Niezrozumiałe jest też zdanie zawarte w podrozdziale 12.1 (opis układu przepływowego PEDD-MCFA) zaczynające się od „Trzeci moduł odpowiadała za naprzemienną... itd.". Pisząc o interferencjach występujących w związku z obecnością białek w surowicy, Doktorantka nie precyzuje ile i jakie białka w surowicy są obecne oraz dlaczego wybrała tylko albuminę wołową jako modelowy interferent? Na str. 100 pisząc, że chlorowodorek guanidyny powoduje desorpcję z powierzchni białek warto byłoby napisać jakich substancji ta desorpcja dotyczy i poprzeć to stwierdzenie odniesieniem do literatury. Na tej samej stronie znajduje się zupełnie niezrozumiałe zdanie: „Aby uzyskać wyniki niezakłócone innymi interferentami wykorzystano ich roztwory wodne”. Na rys. 53 (jedynym, na którym dla najwyższych stężeń żelaza sygnał ma prawidłowo najniższą wartość) niestety brak jest informacji jakich stężeń te sygnały dotyczą. Tabela 28 pozostaje w pracy praktycznie bez komentarza.... Mając informację, że dodatek tiomocznika redukuje sygnały od miedzi do poziomu 5 i 10% dla odpowiednich roztworów kompleksujących czytelnik nie bardzo wie co ma z taką informacją zrobić, czy ta informacja jest dobra czy raczej niekoniecznie...

Doktorantka opisując procedurę analizy próbek surowic (podrozdział 12.3) nie umieszcza kluczowych informacji:

- na czym polegał pomiar widm różnicowych i w którym miejscu w pracy są one zamieszczone?,

- jaka metoda analityczna w przypadku porównania wyników było metodą referencyjną?,
- jaki roztwór w tej metodzie był odnośnikiem w pomiarach?
- jakie są parametry analityczne metody referencyjnej stosowanej w laboratorium klinicznym?

(objętość próbki, czas analizy, koszt jednostkowy analizy, koszt aparatury etc.) to pozwoliłoby czytelnikowi stwierdzić, czy przedstawiony przez Doktorantkę system przepływowy rzeczywiście może być uznany za korzystną alternatywę dla klinicznych analizatorów.

Wyjaśnienia moim zdaniem również wymaga fragment pracy, w którym Pani Natalia Rybkowska - Kucharczyk opisuje badania specjacji żelaza umieszczony na str. 108:

- na jakiej podstawie, nie podając ilości pomiarów i RSD, można uznać, że sygnał jest stabilny?
- jak definiowana jest zmiana absorbancji (rys. 57)?
- przy jakiej dł. fali mierzono absorbancję?
- jaki sens ma stwierdzenie umieszczone na wykresie „0 min czas reakcji”?

Podobnie na str.111 niejasne jest stwierdzenie że reakcja trwała 0 minut (także rys.62); co to jest różnica w liniach trendów i jakie jest kryterium istotności tych różnic? Na schemacie układu przepływowego do badań specjacji żelaza niewyjaśniona jest funkcja zaworu zwrotnego oraz stwierdzenie (z opisu procedury), że do układu wprowadzano naprzemiennie „próbkę i środowisko”. Opis przygotowania roztworów żelaza z białkiem (str.112) sugeruje, że w jednym roztworze żelaza jednocześnie występowały 3 stężenia jednego białka, co jest przecież niemożliwe....Doktorantka nie podaje również, w jaki sposób wyznaczyła dolne granice wykrywalności i oznaczalności żelaza (str. 113) oraz nie wyjaśnia dlaczego parametry te są gorsze dla warunków fizjologicznych (str.114) oraz dlaczego poziom białka wpływa na szybkość tworzenia kompleksu żelazo-ferrozyna. W opisie przebiegu sygnału dla oznaczenia parametru UIBC w próbce surowicy kontrolnej, przedstawionym na rys. 64, wyjaśnienia wymaga zdanie: *„Obserwowana wysokość sygnałów pochodzi od zmętnienia, a także absorpcji próbki surowicy i odczynnika chromogennego”*, które jest po prostu niejasne. We fragmencie poświęconym omówieniu wyników analiz surowic uzyskanych ze Szpitala Klinicznego Doktorantka komentując 10 krotnie niższy wynik uzyskany metodą referencyjną dla próbki S6 błędnie odnosi się do tabeli 31 zamiast do tabeli 32, oraz nie popiera konkretnymi informacjami stwierdzeń, że metody immunochemiczne są kosztowne i pracochłonne w porównaniu z opracowanymi przez nią procedurami analitycznymi.

Ponadto, we wszystkich tabelach zamieszczonych w pracy zawierających odchylenia standardowe brak jest informacji w jaki sposób zostały one wyznaczone, czy stosowano np. test t-Studenta dla niewielkiej liczby pomiarów powiększając wyznaczone odchylenie standardowe o t_{kr} dla odpowiedniej liczby stopni swobody i określonego przedziału ufności??

Nieco rażące w recenzowanej pracy są też **niefortunne sformułowania** używane przez Panią Natalię Rybkowską – Kucharczyk, wśród których w losowej kolejności wspomnę jedynie określenia: „narzucić potencjał na elektrodę”, „prąd charakteryzujący się czułością i

powtarzalnością”, „pobudzenie zatworu lub pompy”, „układ zmechanizowany”, „wykorzystać stężenie w pomiarach”, „dokonano dodatku”, „stacjonarny sygnał” itd.

Najbardziej jednak, jako recenzentowi tej pracy i pracownikowi naukowemu na wyższej uczelni, brakuje mi w niej **dyskusji uzyskanych przez doktorantkę wyników** i to zarówno dotyczących samych konstrukcji systemów przepływowych, układów detekcyjnych, jak i wyników oznaczania żelaza. **Brak jest odniesień do wyników / rozwiązań uzyskanych w innych grupach badawczych**, pozwalających odpowiedzieć Doktorantce na fundamentalne pytania, które powinien sobie zadawać każdy doktorant i pracownik naukowy:

- czym moje opracowania różnią się prezentowanych w literaturze?,
- w których obszarach mogę wskazać elementy nowości naukowej w mojej pracy?,
- w czym moje rozwiązania są lepsze lub gorsze od innych?,
- jaka jest ekonomika moich rozwiązań w porównaniu np. ze standardami stosowanymi w komercyjnych laboratoriach analitycznych?,
- w których obszarach dostrzegam możliwość kontynuacji moich badań?

Przedstawienia takiej właśnie dyskusji oczekuję od Doktorantki w trakcie publicznej obrony jej rozprawy doktorskiej.

Mimo tylu krytycznych uwag dostrzegam jednak w pracy Doktorantki **szereg mocnych stron** do których należą bez wątpienia:

- duże zaangażowanie Doktorantki w badania naukowe,
- rzetelne podejście do problemu analitycznego,
- interdyscyplinarny charakter jej prac – od doboru elementów optoelektronicznych przez zestawienie układów przepływowych o różnym stopniu skomplikowania, analizę komercyjnych preparatów farmaceutycznych o stosunkowo nieskomplikowanej matrycy po skomplikowaną analizę specyjną żelaza w rzeczywistych próbkach pobieranych od pacjentów.

Podsumowując stwierdzam, przedłożona do recenzji rozprawa doktorska autorstwa Pani Natalii Rybkowskiej - Kucharczyk, zawiera wyniki badań opublikowane w czasopismach naukowych o wysokim współczynniku oddziaływania (IF). Stwierdzam także, że recenzowana rozprawa doktorska (mimo wielu niedociągnięć) odpowiada warunkom określonym, w art. 13 ustawy z dn. 14 marca 2003r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65/2003 poz. 595 z późniejszymi zmianami) i wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie Pani mgr Natalii Rybkowskiej Kucharczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Michał Chudy