

Dr hab. inż. Magdalena Szczerbowska-Boruchowska
Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej
Akademia Górniczo-Hutnicza
Al. Mickiewicza 30
30-059 Kraków

Kraków, 22.11.2016 r.

Recenzja

pracy doktorskiej mgr Magdaleny Golasik pt. "Badanie toksykokinetyki tytanu oraz obrazowanie jego wewnątrzkomórkowej dystrybucji". Promotorem pracy był prof. dr hab. n. med. Wojciech Piekoszewski a rolę promotora pomocniczego pełniła dr Małgorzata Herman. Praca powstała w Zakładzie Chemii Analitycznej Wydziału Chemii UJ.

Rozprawa doktorska mgr M. Golasik ma charakter pracy aplikacyjnej a zarazem interdyscyplinarnej, łączącej wykorzystanie współczesnych technik analitycznych z problematyką, dotyczącą oznaczeń Ti w postaci jonowej w materiale biologicznym / klinicznym. Współczesna medycyna czy biologia do rozwiązania problemów z obszaru biochemii niejednokrotnie wymagają włączenia technik analitycznych z zakresu chemii czy fizyki. Tak też było w przypadku opiniowanej przeze mnie dysertacji doktorskiej. Tytan, jak to zostało również podkreślone w pracy, jest pierwiastkiem, z którym przeciętny człowiek spotyka się relatywnie często, stąd duże prawdopodobieństwo migracji tego pierwiastka do narządów / komórek organizmu. Rola czy też realne zagrożenie ze strony tego ksenobiotyku dla organizmu nie zostało jeszcze w pełni poznane. W związku z tym, tematyka podjęta w doktoracie p. Magdaleny Golasik jest bardzo aktualna i w pełni uzasadniona.

Przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Magdaleny Golasik ma formę monotematycznego cyklu czterech artykułów naukowych, opublikowanych w czasopiśmie z bazy Journal Citation Reports (JCR). Ta część pracy poprzedzona jest streszczeniem w języku polskim i angielskim, wprowadzeniem w problematykę doktoratu jak również omówieniem prac w języku polskim. Część wprowadzająca, z uwzględnieniem bibliografii, wykorzystanej w części wstępnej pracy i spisem publikacji składających się na rozprawę doktorską, liczy 80 stron. W dalszej części opiniowanej dysertacji doktorskiej zamieszczono wydruki czterech artykułów naukowych, będących podstawą doktoratu, które ukazały się w następujących czasopiśmie: *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* (IF 3,379), *Toxicology Letters* (IF 3,522), *BioMetals* (IF 2,134) oraz *Metallomics* (IF 3,540). Ponadto, w pracy przedstawiony jest dorobek mgr M. Golasik z wykazem publikacji naukowych, wystąpień konferencyjnych, projektów badawczych, stypendiów naukowych oraz informacja o działalności organizacyjnej. W związku z tym, że wszystkie artykuły naukowe stanowiące podstawę doktoratu mgr M. Golasik są wieloautorskie całość uzupełniona jest także o oświadczenia współautorów tych publikacji. Zgodnie z zaleceniami Centralnej Komisji ds. Stopni i Tytułów oświadczenia przedstawiają rzeczowo wkład wszystkich współautorów w powstanie publikacji. Na tej podstawie mogę stwierdzić, że udział p. M. Golasik w powstaniu artykułów (a tym samym w realizacji tematyki doktoratu) jest decydujący. We wszystkich artykułach p. Golasik jest pierwszym autorem i była zaangażowana we wszystkie etapy prac począwszy od koncepcji i planów badań, poprzez pozyskiwanie środków

finansowych, udział w przygotowaniu i pomiarach materiału badawczego, opracowaniu wyników po powstanie publikacji.

Cykl artykułów naukowych, przedłożonych jako podstawa dysertacji doktorskiej mgr Magdaleny Golasik oprócz tego, że jest układem ściśle powiązanych tematycznie publikacji, co stanowi wymóg ustawy, jest przykładem bardzo logicznego, kompleksowego nurtu badawczego, zrealizowanego przez Autorkę. Pierwsza praca poświęcona jest opracowaniu i optymalizacji metody oznaczania tytanu w skali makroskopowej z wykorzystaniem techniki atomowej spektrometrii absorpcyjnej z atomizacją w piecu grafitowym (GFAAS). W kolejnej publikacji Autorka rozprawy wykorzystuje opracowaną przez siebie metodę do konkretnego zagadnienia skupionego wokół badania toksykokinetyki tytanu w postaci jonowej na modelu zwierzęcym. W oparciu o pozyskane wyniki p. Golasik podejmuje bardziej szczegółowe badania narządów zwierząt doświadczalnych, już na poziomie mikroskopowym stosując rentgenowską mikroanalizę fluorescencyjną, bazującą na promieniowaniu synchrotronowym. I wreszcie czwarta praca, przeglądowa, skupia się na mechanizmach działania Ti w postaci jonowej na organizm. Tak zaprojektowany układ badań, zrealizowanych w ramach doktoratu, świadczy to dojrzałości naukowej p. Golasik jako młodego badacza. Potwierdza to również liczba wszystkich publikacji naukowych p. Magdaleny Golasik, w których w większości (12/18) jest ona pierwszym autorem. Należy dodać, że trzy z artykułów naukowych wchodzących w skład dysertacji doktorskiej p. M. Golasik posiadają IF powyżej 3, a jeden powyżej 2, co również podkreśla wysoki poziom prac stanowiących niniejszą rozprawę doktorską.

Dokonując oceny rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Golasik, należy stwierdzić, że zasadniczy cel pracy został osiągnięty. Autorka wykorzystwała model zwierzęcy do oceny zachowania jonowej postaci Ti w organizmie, wyznaczając czasowe i przestrzenne parametry dystrybucji związku tego pierwiastka jak również podstawowe parametry toksykokinetyczne. Badania przeprowadzono dla dwóch głównych dróg, jakimi Ti może wnikać do organizmu tj. dożylną (symulacja ukierunkowana głównie na uwalnianie Ti z implantów do sąsiadujących tkanek) i dożołądkowej, dostarczając tym samym nowatorskich obserwacji o zachowaniu tego pierwiastka w organizmach z uwzględnieniem sposobów jego wchłaniania, dystrybucji i wydalania. Autorka pokazała również bardziej precyzyjnie tj. w skali mikroskopowej, w jakich obszarach badanych narządów stwierdza się silniejsze gromadzenie Ti (prace z wykorzystaniem techniki μ -SRXRF) i jaka jest topografia tego ksenobiotyku w strukturach anatomicznych analizowanych narządów. Ważnym osiągnięciem recenzowanej rozprawy doktorskiej jest stwierdzenie wzrostu zawartości tytanu w ważnych dla organizmu organach, takich jak np. nerki, śledziona, wątroba, po długotrwałym podawaniu tego ksenobiotyku. Stanowi to potwierdzenie a zarazem niepokojące doniesienie, o możliwości akumulacji tytanu w ustroju w wyniku długoterminowego narażenia na ten pierwiastek np. poprzez produkty spożywcze czy posiadane implanty. Od strony analitycznej należy zaznaczyć, że przeprowadzenie doświadczeń mających na celu oznaczenie Ti w surowicy i tkankach miękkich wiązało się z wcześniejszym opracowaniem, optymalizacją jak i walidacją procedury oznaczania tytanu w tkankach za pomocą techniki GFAAS. Wyniki swoich prac Doktorantka przedstawia na tie

aktualnych doniesień literaturowych, pokazując tym samym również dobrą orientację w realizowanej tematyce badawczej.

Przyjęta przez Autorkę forma doktoratu pomimo, że zasadniczo oparta jest na już opublikowanych artykułach, w części wprowadzającej pozostawia jeszcze miejsce na „pochwalenie się” nowymi wynikami badań, które głównie ze względu na charakter prac wstępnych nie zostały jeszcze opublikowane. Recenzentowi, rozszerza zaś możliwości przedstawienia również pewnych uwag krytycznych, w sytuacji gdy opiniuje rozprawę doktorską opartą na już recenzowanych uprzednio artykułach. W odniesieniu do pracy doktorskiej mgr Magdaleny Golasik nie ma ich zbyt wiele, niemniej jednak z obowiązku recenzenta czuję się zobowiązana do ich przedstawienia obok pewnych punktów do dyskusji podczas obrony pracy doktorskiej.

1. Specyfika materiału biologicznego niejednokrotnie wymaga dostosowania, optymalizacji istniejących procedur badawczych czy wręcz opracowania od podstaw aparatu analitycznego. Istotnym jest tu właściwe dobranie możliwości określonych metod badawczych do postawionych problemów, wiążące się często z wyważeniem „zysków i strat” przy wyborze danej techniki pomiarowej. Należy zwrócić uwagę nie tylko na jak najlepszą wykrywalność / oznaczalność danej metody ale również na parametry takie jak czas pomiaru, preparatykę próbek, ilość materiału wymaganą do prowadzenia analizy, dodatkowe informacje, których równocześnie dostarcza dana metoda, a które mogą poszerzać zdobywaną wiedzę, dostępność aparatury badawczej i oczywiście koszty związane z wyborem takiej a nie innej metody badawczej. W rozprawie doktorskiej p. Golasik porównuje wybraną przez siebie technikę (GFAAS) ze spektrometrią mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie (ICP-MS). Czy inne ze znanych Autorce technik, byłyby użyteczne do oznaczeń Ti w tkankach i jeśli tak co zdecydowało, że zdecydowała się na atomową spektrometrię absorpcyjną z atomizacją w piecu grafitowym.

2. Bardzo ciekawym aspektem badań podjętym przez Autorkę jest ocena zmian stężenia Ti w tkankach w czasie po wszczępieniu implantów. Po zebraniu odpowiedniego materiału badawczego i istotnym zwiększeniu populacji próbek wyniki mogą okazać się bardzo wartościowe, np. w aspekcie m. in. zależności pomiędzy akumulacją Ti a stanem zdrowia. W oparciu o dotychczasowe wyniki, dot. poziomu Ti w tkankach przed implantacją, p. Golasik stwierdza, że „Szeroki zakres uzyskanych wyników można uzasadnić odmienną ekspozycją na tytan w życiu codziennym, zwłaszcza u dzieci, które spożywają zazwyczaj dużo słodczy...” Na jakiej podstawie Autorka wysuwa „hipotezę” o zbieżności wysokiego poziomu tytanu z wiekiem pacjentów i spożywaną ilością słodczy? Czy zaobserwowany wysoki poziom Ti w tkankach koreluje w jakiś sposób z wiekiem pacjentów? Czy wyższe wartości stężeń Ti uzyskano w grupie młodszych pacjentów / dzieci?

3. W przypadku badań dot. powierzchniowego obrazowania Ti w tkankach z wykorzystaniem synchrotronowej rentgenowskiej mikroanalizy fluorescencyjnej wartościowym byłoby zestawienie uzyskiwanych map dystrybucji pierwiastków z obrazem histologicznym tkanki lub chociażby obrazem mikroskopowym skanowanego obszaru próbek. Autorka wspomina w swojej pracy o planach włączenia badań histopatologicznych czy immunohistochemicznych, niemniej jednak na tym etapie prac, proste porównanie map

chemicznych z obrazem badanej tkanki mogłoby być już źródłem informacji o pewnych strukturach obecnych w próbkach (naczynia krwionośne, różne typy komórek, różne struktury morfologiczne w obrębie narządów, artefakty, itp.), które w mikroskopie optycznym są względnie dobrze rozróżnialne. Dla przykładu podłużne struktury widoczne na rys. 8, wykazujące wysoki poziom Fe (ale również Ti) są najprawdopodobniej naczyniami krwionośnymi. Czy w celu interpretacji uzyskanych map dystrybucji pierwiastków tego typu analiza była stosowana?

4. Prowadzenie analizy dystrybucji pierwiastków wewnątrz narządów, w oparciu o ich masy powierzchniowe, tak jak zaprezentowano w pracy A.3, niesie za sobą ryzyko błędnej interpretacji uzyskiwanych map chemicznych. Niejednorodność masy powierzchniowej próbki, związana z lokalnymi różnicami w jej gęstości/grubości, będzie pociągać za sobą różnice w masach powierzchniowych pierwiastków, niekoniecznie przekładające się na różnice w stężeniu pierwiastka. Przykładem mogą być, wspomniane powyżej, ściany naczyń krwionośnych (rys. 8). W tego typu badaniach należy dążyć więc do eliminacji efektów związanych z różnicą mas powierzchniowych próbki. Jakie rozwiązanie Autorka widziałaby aby zminimalizować wpływ masy powierzchniowej próbki na prezentowane przez siebie wyniki badań?

5. Omawiając wyniki badań, przeprowadzonych z wykorzystaniem techniki μ -SRXRF Autorka zwraca uwagę na punkty w obszarze próbek o ekstremalnie wysokich „zawartościach” czy bardziej poprawnie masach powierzchniowych np. Ca i Ti. Czy punkty te dają jakies odzwierciedlenie w obrazie mikroskopowym tkanki? Jak wygląda porównanie widm zmierzonych w takich właśnie punktach z widmami z „typowych” obszarów tkanki? W pracy nie zostało zaprezentowane żadne widmo zmierzone techniką μ -SRXRF w analizowanych próbkach, dlatego może w trakcie obrony dobrze byłoby pokazać nie tylko topografię pierwiastków w skrawkach tkanek, ale i ten „bezpośredni” rezultat pomiarów, jakim jest widmo promieniowania wzbudzonego w tkankach, które niesie informację o rejestrowanych pierwiastkach.

6. Jakie granice wykrywalności / oznaczalności Ti i innych pierwiastków w mierzonych tkankach uzyskano, przy zastosowanych warunkach pomiarowych w technice μ -SRXRF? Czy relatywnie małodostępne źródło promieniowania rentgenowskiego jakim jest synchrotron stanowi jedyne rozwiązanie dla tego typu analiz?

7. Przedstawienie rezultatów pomiarów w pracy analitycznej musi być opatrzone informacją o oszacowanej niepewności wyniku. W pewnych punktach recenzowanej pracy doktorskiej ta informacja jest jednak pomijana. Ponadto, prezentacja wyników na etapie pracy doktorskiej powinna już zawierać poprawne zapisy wyników pomiarów, co nie zawsze jest przestrzegane w niniejszej rozprawie doktorskiej. Są to oczywiście pewne szczegóły, o których wspominam raczej pod kątem nabrania przez Autorkę „dobrych nawyków” na przyszłość. I tak:

- Na str. 39 i w pracy A.1 Autorka podaje bardzo precyzyjnie osiągnięty „poziom” masy charakterystycznej, tj. 88 pg w odniesieniu do wartości podawanej przez producenta (70 pg). Biorąc pod uwagę, że podawany jest tylko „poziom” uzyskanych wartości przedstawiony

wynik, w mojej opinii, jest zbyt dokładny. Jakiego rzędu są niepewności do wyznaczanych wartości mas charakterystycznych?

- Podobnie, na str. 39 i w pracy A.1 brak niepewności wyznaczanych granic wykrywalności.
- Na str. 42, w Tab. 1 wartości stężeń tytanu w tkance okołoprzeszczepowej również przedstawione są bez niepewności wyników. Jakiego rzędu wielkości są niepewności wartości uzyskiwanych w analizie i co jest ich źródłem? Ponadto, wyniki podane są z różnymi dokładnościami (w zapisie zastosowano różne liczby cyfr znaczących).
- W Tabelach 2, 3 oraz Tab. 3/A.1, Tab. 1/A.2 i Tab. 2/A.2 w zapisach niepewności przedstawianych wyników uwzględniono różne liczby cyfr znaczących od jednej do aż trzech.

Podsumowując, przedłożona mi do zaopiniowania rozprawa doktorska mgr Magdaleny Golasik wskazuje na duże umiejętności Autorki zarówno w prowadzeniu prac doświadczalnych, analizie danych i interpretacji uzyskiwanych wyników w oparciu o posiadaną wiedzę z dziedziny tematyki badawczej. Dorobek naukowy Doktorantki został upubliczniony w renomowanych czasopismach naukowych, jak również w formie wystąpień konferencyjnych, co potwierdza również duże znaczenie problematyki badawczej podejmowanej przez mgr M. Golasik w ramach doktoratu.

Konkludując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Magdaleny Golasik pt. "Badanie toksykokinetyki tytanu oraz obrazowanie jego wewnątrztkankowej dystrybucji" spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami) i wnoszę o dopuszczenie mgr Magdaleny Golasik do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, pomimo zamieszczonych powyżej uwag, pracę doktorską mgr Magdaleny Golasik oceniam bardzo wysoko i wnioskuję o jej wyróżnienie.



Magdalena Szczerbowska-Boruchowska