



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM MEDICUM

**Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum**

Wydział Farmaceutyczny

Prof. dr hab. n. farm. Maria Walczak

Katedra i Zakład Toksykologii

ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków

e-mail: maria.walczak@uj.edu.pl;

tel. +4812/6205630

## RECENZJA

**rozprawy doktorskiej mgr inż. Damiana Kobylarza**

Kraków, dn. 30 grudnia 2024 r.

Ocenę przygotowano na podstawie pisma Rady Naukowej Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego, CM.5.52.520.5200.002.2024 z dn. 15 listopada 2024 r.

### Informacje ogólne

Podstawą ubiegania się mgr inż. Damiana Kobylarza o stopień naukowy doktora są badania dotyczące tematyki zatytułowanej „Opracowanie ‘białej’ metody *in situ* oznaczania wybranych pierwiastków toksycznych metodą pXRF w kościach na potrzeby laboratoryjnej toksykologii sądowej”.

Rozprawa doktorska została przygotowana w formie tradycyjnej, czyli monografii obejmującej 104 strony i składającej się ze wstępu będącego wprowadzeniem do aspektu biologicznego i analitycznego tematu, celu pracy, opisu zastosowanej metodologii, wyników badań, wniosków z uwzględnieniem odpowiedzi na zadane pytania badawcze, bibliografii składającej się ze 172 pozycji ułożonych w sposób alfabetyczny oraz streszczenia w języku polskim i angielskim.

### Ocena rozprawy doktorskiej

Przedmiotem badań pracy doktorskiej mgr inż. Damiana Kobylarza było opracowanie metody oznaczania wybranych pierwiastków toksycznych, takich jak Pb, Cd i Sr z zastosowaniem przenośnego urządzenia wykorzystującego fluorescencję rentgenowską (pXRF) w kościach, w aspekcie potencjalnego zastosowania tej metody w toksykologii sądowej na rzecz wymiaru sprawiedliwości i organów ścigania. Oceniana praca doktorska została

wykonana w Zakładzie Toksykologii Regulacyjnej i Sądowej Instytutu Ekspertyz Medycznych w Łodzi pod kierunkiem Promotora dr hab. Kamila Jurowskiego, prof. UR, prof. IEM oraz Promotora pomocniczego dr n. med. Agaty Michalskiej.

W części teoretycznej pracy Doktorant przedstawił informacje naświetlające zakres tematyczny podjętych badań oraz wprowadzono czytelnika w temat pierwiastków toksycznych, które wykazują potencjał do kumulacji w kościach, w tym Pb, Sr i Cd. Ponieważ narażenie na metale ciężkie jest powszechnym problemem, a krew jest tradycyjnie wykorzystywaną matrycą do oznaczania pierwiastków toksycznych, Doktorant podjął się zadania opracowania i walidacji metody oznaczania wybranych metali w kościach. Z uwagi na fakt, że metale wbudowują się w strukturę kości, dlatego też kości są często jedyną dostępną matrycą w procesach sądowych, a stężenie tych pierwiastków można zmierzyć przy użyciu przenośnych technik analitycznych. Do takich technik zaliczana jest przenośna fluorescencja rentgenowska, dzięki której możliwe jest szybkie i nieinwazyjne oznaczanie metali ciężkich w matrycach biologicznych bez konieczności transportowania próbek do laboratorium analitycznego.

W bazie PubMed znajdujemy jedną pracę przeglądową opublikowaną w Current Environmental Health Reports (2024) dotyczącą oznaczania Pb w kościach, nie znajdujemy prac dokumentujących oznaczanie Cd i Sr w tej matrycy z zastosowaniem urządzenia pXRF, dlatego też zagadnienia analityczne poruszane przez Autora są oryginalne. Niezwykle istotne jest zwrócenie przez Doktoranta uwagi na brak metod analitycznych, które pozwoliłyby na szybkie i wiarygodne oznaczanie metali ciężkich w kościach, w tym również badania przesiewowe, w sposób nieniszczący materiału, z zachowaniem integralności strukturalnej próbki. W tym aspekcie brakuje jednolitych rozwiązań, co jest jednym z istotnych problemów współczesnej toksykologii.

Z uwagi na udokumentowaną toksyczność metali ciężkich, w rozdziale tym podkreślono konieczność opracowania czułych, specyficznych i selektywnych metod analitycznych celem przeprowadzenia pełnych badań toksykologicznych na potrzeby wymiaru sprawiedliwości. W tym aspekcie Doktorant zwrócił uwagę na źródła narażenia na pierwiastki toksyczne, mechanizm wbudowywania się pierwiastków w strukturę kości, stabilność metali ciężkich w środowisku naturalnym, w szczególności na fakt, że pierwiastki toksyczne nie ulegają biodegradacji. Ponieważ Autor posługuje się pojęciem „toksykologia sądowa i regulacyjna” proszę o wyjaśnienie czy dostępne są poziomy lub limity dopuszczalnych stężeń oznaczanych metali w próbkach kości.

We wstępie pracy poruszono zagadnienia dotyczące m.in. toksykokinetyki Pb. Na Ryc. 1 przedstawiono schemat toksykokinetyki tego pierwiastka, jednak w moim odczuciu jest to schemat dyspozycji tego metalu w organizmie po narażeniu doustnym. Poruszając się wokół zagadnień toksykokinetyki Pb, proszę o wyjaśnienie zależności pomiędzy stężeniem tego pierwiastka w środowisku, a stężeniem we krwi, tkankach miękkich i kościach. Czy jest znany okres półtrwania Pb w tkankach i narządach? Jak przebiega eliminacja Pb w przypadku nieliniowości procesów kinetycznych? Jakimi parametrami kinetycznymi można opisać toksykokinetykę tego pierwiastka? Jakie są subtoksyczne i toksyczne stężenia Pb? Czy znana jest toksykokinetyka Cd i Sr? Czy są dostępne normy regulujące zawartość metali ciężkich we krwi i tkankach? Jakie są wskazania regulacyjne zawartości metali ciężkich w organizmie, w tym w kościach?

W celu pracy Autor przedstawił założenia podjętych badań, w tym zidentyfikowanie pierwiastków toksycznych o największym znaczeniu dla układu kostnego człowieka wraz z zakresami stężeń w kościach ludzi, opracowanie i walidacja metody pozwalającej na analizy przesiewowe dużej ilości próbek w krótkim czasie, z zachowaniem integralności analizowanego materiału dowodowego, z możliwością jego ponownego zastosowania w innych analizach toksykologicznych oraz opracowanie i optymalizacja techniki otrzymywania wzorców stałych, odzwierciedlających matrycę kostną. Cele badań zostały jasno sformułowane i dotyczą problemów istotnych z punktu widzenia analiz toksykologicznych metali ciężkich.

W części poświęconej **materiałom i metodom** Doktorant wymienił odczynniki użyte do przygotowania wzorców stałych, procedury badawcze, które pozwoliły na śledzenie zaplanowanych etapów badań i uzyskane wyniki. Zapoznając się z tym rozdziałem, proszę o wyjaśnienie dla jakich materiałów popiół kostny może być użyty jako certyfikowany materiał odniesienia? Dlaczego popiół kostny o ściśle zdefiniowanej zawartości metali nie nadaje się do kalibracji urządzenia pXRF? W moim odczuciu wydają się zbędne zdjęcia pomocniczych urządzeń laboratoryjnych, takich jak suszarka laboratoryjna, waga analityczna czy mikser laboratoryjny. W rozdziale tym wprowadzono własne, żargonowe pojęcia, takie jak LODy (str. 51), wysoki baseline (str. 51) czy silnie uzależniony (str. 51). Proszę o podanie wytycznych na podstawie których przeprowadzono walidację metody. Wyznaczając precyzję metody czy mierzono wielokrotnie (ile razy?) jedną próbkę, czy różne próbki? Z opisu wynika, że wykonano wielokrotne pomiary jednorodnej próbki, co potwierdza precyzję urządzenia ale nie metody. W tym aspekcie, Autor wyznaczając granicę oznaczalności wskazuje na wytyczne Amerykańskiej Agencji Ochrony Środowiska (EPA) nie podając stosownej referencji. Dlaczego Autor wskazuje 5% jako wartość graniczną względnego odchylenia standardowego? W wytycznych dotyczących walidacji metod analitycznych precyzja metody nie powinna przekraczać 15%, z wyjątkiem stężenia przyjętego za LOQ, dla którego dopuszczalny jest 20% rozrzut.

Kolejną część pracy stanowią **wyniki** z przeprowadzonych badań, zebrane w postaci 8 wykresów oraz 12 tabel. Aspekt nowatorski przeprowadzonych badań wiązał się z przygotowaniem odpowiednich wzorców kości celem kalibracji urządzenia pXRF. Krytyczne podejście do opracowania metody analitycznej jest szczególnie ważne gdyż pokazuje zrozumienie istotności tego etapu prac i jego wpływu na wyniki badań właściwych próbek, a tym samym interpretację biologiczną uzyskanych wyników oraz dowodzi jakości przeprowadzonych badań. Na wykresach 1, 3, 4 i 5 przedstawiono liniowe zależności pomiędzy stężeniem teoretycznym a stężeniem oznaczonym pierwiastków, co nazwano krzywą kalibracyjną. Krzywa kalibracyjna jest zależnością pomiędzy odpowiedzią detektora a stężeniem/ilością analitu w próbce. Podpisy pod wykresami 1 i 2 są takie same. Proszę o wyjaśnienie w jaki sposób przygotowano krzywe wzorcowe oraz jaka jest różnica pomiędzy wykresami 1 i 2. Proszę wyjaśnić różnicę pomiędzy granicą oznaczalności (LOQ) a dolną granicą oznaczalności (LLOQ). Pojęcia te są przez Autora używane zamiennie (str. 64). Autor używa pojęcia „oznaczanie precyzji”, str. 65. Czy precyzję metody można oznaczyć czy raczej wyznaczyć? W moim odczuciu jest to dość istotna różnica. Czy analizowano wpływ zanieczyszczeń matrycy kostnej innymi pierwiastkami na wyniki oznaczeń metali? Innymi słowy, czy badano efekt matrycy? Jeśli tak, to jaki był wpływ matrycy na wyniki walidacji metody? Czy Doktorant może wskazać metody pozwalające zminimalizować efekt matrycy i skomentować wpływ tego zjawiska na otrzymane wyniki swojej pracy? Na jakiej podstawie dobrano parametry techniczne do przygotowywania formulacji kostnej? Proszę o podanie

danych dokumentujących wpływ siły nacisku, czasu prasowania oraz temperatury na wyniki oznaczeń metali ciężkich. Czy oceniono strukturę przygotowanego materiału kostnego? Jeśli tak, za pomocą jakiej techniki analitycznej? Jaka była powtarzalność i odtwarzalność metody analitycznej? W pracy nie zamieszczono danych z badania stabilności wzorców hydroksyapatytowych z zawieszonymi w tej matrycy pierwiastkami toksycznymi. Jak długo próbki wzorców są stabilne? Na jakiej podstawie zdecydowano o warunkach przechowywania wzorców użytych w pracy? Czy wyniki badań porównano z techniką referencyjną, np. z ICP-MS? Czy opracowana metoda została użyta do oznaczenia metali w próbkach rzeczywistych?

**Dyskusja** wyników zarówno w aspekcie analitycznym jak i biologicznym przeprowadzona została poprawnie. Autor odniósł się do wyników opisanych w literaturze. W moim odczuciu fragmenty tekstu ze str. 77 i 78 dotyczące rozproszenia rentgenowskiego badanych pierwiastków zamieszczone w dyskusji wyników powinny zostać przeniesione do metodyki badań. Pod względem edytorskim, pomimo kilku potknięć, praca została zredagowana starannie, w sposób estetyczny i przejrzysty. W pracy nie znaleziono błędów interpunkcyjnych, ortograficznych lub gramatycznych, jedynie drobne błędy literowe lub nieścisłości, takie jak wyjaśnienia skrótów i konsekwentne posługiwanie się nimi w dalszych częściach pracy. Pomocnym z punktu widzenia recenzenta byłby wykaz skrótów użytych w pracy.

W przedstawionej do recenzji pracy, zaplanowane badania są nowatorskie i bez wątplenia wypełniają lukę w obszarze metod analitycznych możliwych do zastosowania w toksykologii regulacyjnej. Dyskusja wyników jest merytoryczna i oparta na odpowiednio dobranych anglojęzycznych pozycjach literaturowych. Uzyskane wyniki badań w znacznym stopniu poszerzają wiedzę w obszarze metod do przesiewowego oznaczania metali ciężkich w kościach i mają potencjalną wartość aplikacyjną do zastosowania w kryminalistyce i medycynie sądowej, a także na potrzeby organów regulacyjnych.

## **Podsumowanie**

Reasumując należy stwierdzić, że rozprawa doktorska mgr inż. Damiana Kobylarza jest oryginalnym opracowaniem dotyczącym optymalizacji i walidacji metody oznaczania trzech metali ciężkich (Pb, Cd, Sr) w kościach z zastosowaniem przenośnego urządzenia pXRF. Badania zostały wykonane z użyciem odpowiednich narzędzi badawczych, wypełniając lukę w obszarze analiz przesiewowych pierwiastków toksycznych. Wyniki badań były prezentowane na jednej konferencji międzynarodowej: 6th International Conference on New Frontiers in Engineering, Science, Law, Management, Humanities and Social Sciences INFES 6.0-2024, *Development of a direct, non-invasive and rapid method for determining selected toxic elements using pXRF (portable X-ray fluorescence spectrometer) in bones for the purposes of forensic laboratory toxicology* (30 – 31.08.2024) oraz dwóch konferencjach krajowych: 1) I Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa "Nauki medyczne w służbie wymiaru sprawiedliwości i organów ścigania", Instytut Ekspertyz Medycznych w Łodzi (wrzesień 2023) *Opracowanie 'białej' metody in situ oznaczania wybranych pierwiastków toksycznych metodą pXRF w kościach na potrzeby laboratoryjnej toksykologii sądowej* oraz 2) XIV Konferencja Naukowo-Szkoleniowa Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego pt.: „Perspektywy i wyzwania współczesnej toksykologii”, 4-6.09.2024 r., *Development of a direct, non-invasive and rapid methods for determining chosen toxic elements using pXRF (portable X-ray fluorescence spectrometer) in bones for forensic laboratory toxicology*

*purposes*. Doktorant jest pierwszym autorem publikacji przeglądowej w TrAC Trends in Analytical Chemistry opublikowanej w 2023 r. w której poruszono zagadnienia związane z zastosowaniem urządzenia pXRF w badaniach kryminalistycznych.

Podjęte badania są niezwykle ważne ze względu na możliwość aplikacji uzyskanych wyników w obszarze bezpieczeństwa ludzi i środowiska. Wymiernym efektem dysertacji mgr inż. Damiana Kobylarza jest dostarczenie pilotażowej metody pozwalającej na szybkie oznaczanie Pb, Sr i Cd w próbkach kości w efekcie ostrej lub przewlekłej ekspozycji człowieka na metale ciężkie. Z uwagi na działania toksyczne pierwiastków stanowiących przedmiot badań, podjęte w pracy doktorskiej zadanie opracowania i walidacji metody do szybkiego skryningu metali ciężkich w kościach wpisuje się w aktualny nurt badań, a tematyka poruszana przez Autora ma znaczenie praktyczne, w dziedzinach związanych z kryminalistyką, toksykologią sądową, kliniczną i regulacyjną.

We **wniosku końcowym** stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska, pt. „Opracowanie ‘białej’ metody *in situ* oznaczania wybranych pierwiastków toksycznych metodą pXRF w kościach na potrzeby laboratoryjnej toksykologii sądowej” cechuje się istotnymi walorami, do których zalicza się adekwatną do postawionych zadań metodykę oraz aktualność i wartość aplikacyjną uzyskanych wyników. Rozprawę doktorską uważam za ważną w kontekście zagrożeń toksykologicznych, jakie powodują metale ciężkie oraz koniecznością opracowywania nowych metod analitycznych, które nie niszczą materiału dowodowego. Dysertacja mgr inż. Damiana Kobylarza odpowiada warunkom określonym w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, art. 187. - [Rozprawa doktorska] i wnoszę do Rady Naukowej Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego o dopuszczenie mgr inż. Damiana Kobylarza do publicznej obrony tez przedstawionych w dysertacji.

Prof. dr hab. n. farm. Maria Walczak

Katedra Toksykologii UI CM  
Zakład Toksykologii

  
Prof. dr hab. Maria Walczak  
Kierownik Katedry i Zakładu