UNIWERSYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU
Katedra i Zakład Toksykologii
dr hab. n. farm. Ewa Sawicka

Wrocław, dn. 10.12.2024r.

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr inż. Damiana Kobylarza

pt. Opracowanie 'białej' metody in situ oznaczania wybranych pierwiastków toksycznych metodą pXRF w kościach na potrzeby laboratoryjnej toksykologii sądowej

Promotor: ***Dr hab. n. med. i n. o zdr. Kamil Jurowski, prof. UR, prof. IEM***

Promotor pomocniczy: ***Dr n. med. Agata Michalska***

Miejsce prowadzenia badań: Instytut Ekspertyz Medycznych w Łodzi, Zakład Toksykologii Regulacyjnej i Sądowej

1. Podstawa formalna

Podstawą formalną wykonania recenzji była uchwała podjęta w dniu 14 listopada 2024r. przez Radę Naukową Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego, na wniosek Rady Dyscypliny Nauk Medycznych, w sprawie powołania Komisji do przeprowadzenia postępowania o nadanie stopnia doktora dla mgr. inż. Damiana Kobylarza.

2. Tematyka rozprawy

Tematyka, która została podjęta w rozprawie doktorskiej Pana mgr inż. Damiana Kobylarza dotyczy opracowania specyficznej metody umożliwiającej oznaczanie toksycznych pierwiastków (Pb, Cd, Sr) w kościach ludzkich. Kumulacja tego typu pierwiastków w kościach ma znaczenie w toksykologii sądowej. Odnosi się to głównie do przypadków długotrwałego narażenia lub rozkładu ciała, kiedy badanie jest bardzo utrudnione. W kryminalistyce identyfikacja nieznanych substancji ma ogromne znaczenie. Obecnie w tym celu stosuje się

różne techniki analityczne, głównie techniki chromatograficzne, techniki oparte na spektrometrii masowej i techniki analityczne łączone. Zaproponowana przez Pana mgr inż. Damiana Kobylarza tematyka pracy, a mianowicie zastosowanie metody XRF czyli spektroskopii fluorescencji rentgenowskiej w kryminalistyce środowiskowej budzi zrozumiałe zainteresowanie wśród naukowców. Ta technika wykazała duży potencjał w zakresie identyfikacji źródeł skażenia, charakteryzowania materiałów geologicznych, dostarczając cennych informacji do badań środowiskowych. Obecnie używane metody oznaczania pierwiastków w kościach, obejmujące ICP-MS lub ASA, charakteryzują się skomplikowanym przygotowaniem próbki powodującym jej zniszczenie, długim czasem analiz oraz wysokimi kosztami. Kość posiada zdolność do kumulowania różnych ksenobiotyków, w tym substancji toksycznych. Dla toksykologów sądowych kości są materiałem trudnym do badania, stwarzającym wiele problemów eksperymentalnych. Zatem wszelkie próby unowocześniania technik badania tego materiału są zrozumiałe i budzą nadzieję na lepszą diagnostykę, szczególnie w zakresie badań kryminalistycznych. Dlatego tym bardziej należy zaznaczyć celowość i nowatorskość badań w ramach bieżącej rozprawy doktorskiej. Pan mgr inż. Damian Kobylarz podjął się opracowania techniki pXRF - specyficznej metody (*in situ*, nieniszczącej, szybkiej, „białej" i terenowej, umożliwiającej oznaczanie wymienionych wcześniej, toksycznych pierwiastków (Pb, Cd, Sr) w kościach ludzi. Szczególnym zadaniem jakie wyznaczył sobie Doktorant było przystosowanie do badań przenośnego spektrometru pXRF. W tym celu dokonał optymalizacji autorskiej procedury wytwarzania wzorców stałych w kościach przy użyciu odpowiednich sprzętów oraz certyfikowanych materiałów referencyjnych.

Metoda pXRF posiada wiele zalet oraz szerokie zastosowanie. Pozwala na wykonanie relatywnie szybkich analiz w porównaniu do ICP-MS, skutecznych np. w terenie. Jest techniką nieniszczącą, co oznacza, że można analizować cenny materiał badawczy bez jego uszkodzenia, a zatem w pełni nadaje się do zastosowań w naukach sądowych i dochodzeniach kryminalistycznych, gdzie ta cecha jest kluczowa aby nie zniszczyć materiału dowodowego. Jak zostało przedstawione przez Doktoranta pojawiają się w literaturze pojedyncze doniesienia o zastosowaniu tej techniki w kryminalistyce sądowej, uwzględniającej kości jako materiał dowodowy. Brakuje jednak optymalnych i zwalidowanych metod oznaczania metali toksycznych wykorzystujących wzorce stałe, naśladujących lub odzwierciedlających matrycę jaką jest kość człowieka. Przeprowadzone przez Doktoranta badania przyczyniają się do podniesienia standardów w tej dziedzinie, oferując sprawdzoną i zoptymalizowaną procedurę tworzenia wzorców kalibracyjnych dla XRF. Dlatego też, wybór tematyki pracy uważam za celowy i szczególnie cenny zarówno w aspekcie naukowym jak i aplikacyjnym. Recenzowana rozprawa doktorska wpisuje się w aktualne trendy badań w ramach toksykologii sądowej i wnosi wymierne korzyści diagnostyczne.

3. Charakterystyka i ocena rozprawy

Recenzowana rozprawa doktorska Pana mgr inż. Damiana Kobylarza ma typowy układ dla pracy o charakterze monografii. Rozpoczyna się od spisu treści, wstępu i celu pracy. Następnie kolejno prowadzi czytelnika poprzez skrupulatny opis zastosowanych materiałów, metod oraz omówienie wyników i wnikliwą dyskusję, a także wnioski. Całość pracy (104 strony) podsumowano bibliografią składającą się ze 170 pozycji literaturowych poprawnie dobranych

do tematyki rozprawy, w przeważającej części anglojęzycznych. Praca zawiera łącznie 104 strony.

W obszernym **Wstępie** Autor charakteryzuje pierwiastki toksyczne kumulujące się w kościach. Źródła narażenia na tego typu związki obejmują wodę, żywność, odpady przemysłowe i przedmioty codziennego użytku. Ze względu na kumulację toksycznych pierwiastków w kościach, mają one znaczenie w toksykologii sądowej, szczególnie w przypadkach długotrwałego narażenia. Na wstępie Autor wskazuje, że metale ciężkie, takie jak Pb, Cd czy Sr, mogą wbudowywać się w kości poprzez wymianę jonową z hydroksyapatytem. Z kolei proces ten obejmuje wymianę jonów metali ciężkich z jonami Ca2+ znajdującego się w strukturze hydroksyapatytu, co może wpływać na stabilność, właściwości chemiczne i biologiczne kości. Właśnie kumulacja w kościach jest bardzo ważna z punktu widzenia toksykologii, ponieważ pierwiastki toksyczne wpływając na układ kostny, osłabiają wytrzymałość tych struktur naszego organizmu. Doktorant podjął się bieżącego tematu, bowiem jak sam wskazuje we wstępie rozprawy generalnie układ kostny prawie nigdy nie jest w centrum zainteresowania toksykologów z uwagi na inwazyjny charakter badań. Ale dodaje również, że jest to ważny temat z punktu widzenia laboratoryjnej toksykologii sądowej, ponieważ kości mogą być dobrym materiałem badawczym w sytuacjach długotrwałego narażenia na zatrucie metalami ciężkimi. Jest to tym bardziej ważne w sytuacji, gdy nie ma innego materiału badawczego, np. kiedy ciało ofiary zostało spalone lub nastąpiło naturalne rozłożenie i pozostał tylko materiał kostny. W poszczególnych rozdziałach wstępu opisano losy przedstawianych metali: Pb, Cd i Sr dokładnie charakteryzując ich wchłanianie, biotransformację oraz wydalanie. Są to oczywiście podstawowe informacje, ale poznanie toksykokinetyki pierwiastków jest niezbędne dla zrozumienia kolejnych zagadnień w ramach rozprawy. Doktorant zaznacza, że konieczne jest rozważenie wieloaspektowych mechanizmów, za pośrednictwem których ołów zakłóca przebudowę kości oraz aktywność osteoblastów, co dokładnie realizuje opisując toksyczność ołowiu dla kości na poziomie molekularnym. Autor wskazuje, że oprócz ekspozycji środowiskowej kości są również bardzo dobrym materiałem dowodowym w sprawach, w których dochodziło do zbrodniczych zatruć ołowiem. Opisuje przypadek z Polski w którym mężczyzna był narażony na wysokie dawki tlenku ołowiu(II) dodawanego do posiłków przez żonę. Dopiero badania *post mortem* wykazały, że nawet po rozkładzie tkanek miękkich, ołów był obecny w kościach krzyżowych, kości udowej i miednicy w wysokich stężeniach, co potwierdziło przyczynę zgonu mężczyzny. Kolejne obszerne opracowanie w ramach wstępu dotyczy kadmu. Autor szczegółowo opisuje źródła ekspozycji, ze szczególnym uwzględnieniem dymu tytoniowego oraz skutki zdrowotne narażenia na kadm, w tym niewydolność nerek, choroby sercowo-naczyniowe, choroby nowotworowe m.in. rak piersi, prostaty czy pęcherza moczowego. Narządami krytycznymi dla kadmu są również kości stąd zainteresowanie Autora rozprawy właśnie tym metalem ciężkim. Jednym z głównych problemów z nadmiarem kolejnego rozważanego pierwiastka czyli strontu w kościach jest to, że ten toksyczny pierwiastek zastępuje wapń w procesie mineralizacji kości. Długotrwała ekspozycja na wysokie stężenia strontu prowadzi do defektów mineralizacji, do osteomalacji, zahamowania dojrzewania chondrocytów i w efekcie końcowym powoduje osteoporozę. Pan mgr inż. Damian Kobylarz dokonał tak obszernego opracowania dotyczącego

metali bowiem pierwszą ideą Jego rozprawy doktorskiej było odpowiednie dobranie do badania kości człowieka zakresu stężeń ołowiu, kadmu i strontu w tym materiale biologicznym.
Najbardziej kluczowa część wstępu to rozdział nr 2.2, który dotyczy spektroskopii fluorescencji rentgenowskiej (XRF) i stanowi znakomite teoretyczne wprowadzenie do badań doświadczalnych. Autor zaznacza, że pierwsze próby przeniesienia technologii XRF z laboratoriów do zastosowań w badaniach terenowych miały miejsce w latach 70. XX wieku, jednak dopiero rozwój kompaktowych tub rentgenowskich, chłodzonych półprzewodnikowych detektorów pozwolił na stworzenie w pełni przenośnych urządzeń. Na 12 stronach tego rozdziału szczegółowo opisuje zasadę działania XRF, opierającej się na emisji i detekcji promieniowania rentgenowskiego emitowanego przez wzbudzone atomy, ilustrując to dodatkowo schematem nr 2.W podrozdziale 2.2.3. Autor charakteryzuje rodzaje spektroskopii rentgenowskiej, co stanowi bardzo ważny fragment wstępu bowiem dowiadujemy się co oznacza tzw. biała technika analityczna, którą opracował Doktorant do oznaczania pierwiastków toksycznych w kościach na potrzeby laboratoryjnej toksykologii sądowej. Biała Chemia Analityczna (ang. White Analytical Chemistry, WAC) opiera się na zasadach Zielonej Chemii Analitycznej (ang. Green Analytical Chemistry, GAC), uwzględniającej nie tylko przyjazne dla środowiska aspekty, ale także inne ważne czynniki wpływające na jakość metody, a mianowicie kryteria analityczne (czerwone) i praktyczne (niebieskie).
Ta technika nieniszcząca nadaje się do zastosowań w naukach sądowych i dochodzeniach kryminalistycznych, gdzie jak już wspomniano, ważne jest aby nie zniszczyć materiału dowodowego. Pan mgr inż. Damian Kobylarz jest pierwszym autorem artykułu przeglądowego o wysokim współczynniku **IF = 13.1; 200 pkt MEiN** pt. „ Field portable X-ray fluorescence (FP-XRF) as powerful, rapid, non-destructive and 'white analytical tool' for forensic sciences-State of the art." (TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2023) na temat zastosowania techniki pXRF w analizach sądowych. Autor podkreśla innowacyjną i pionierską naturę zastosowania techniki FP-XRF w nauce kryminalistycznej. Doktorant wskazuje, że pojawiają się pierwsze doniesienia o zastosowaniu tej techniki w kościach, ale zaznacza że konieczna jest walidacja metody oznaczania metali z zastosowaniem wzorców naśladujących kość człowieka.

W rozdziale stanowiącym **Cel pracy** Pan mgr inż. Damian Kobylarz przedstawia główny cel badawczy tzn. opracowanie specyficznej metody (tj. in situ, nieniszczącej, relatywnie szybkiej oraz możliwej do zastosowania w warunkach terenowych, np. na miejscu zbrodni, czy podczas ekshumacji zwłok), do oznaczania pierwiastków w materiale dowodowym, jakim są kości ludzi, z zastosowaniem przenośnego spektrometru do fluorescencji rentgenowskiej (pXRF). W założeniach badawczych uwzględnia kolejno opracowanie procedury oznaczania toksycznych pierwiastków w kościach ludzi z zastosowaniem autorskich wzorców stałych, odpowiadających rzeczywistej matrycy kości, opracowanie odpowiedniej strategii kalibracyjnej w oparciu o wytworzone wzorce, optymalizację techniki wytwarzania wzorców stałych, a także optymalizację wszystkich kluczowych parametrów w tym złożonym i wieloetapowym procesie. Cele i założenia badawcze są jasno sprecyzowane, a ponadto Doktorant zadaje sobie jeszcze szczegółowe pytania badawcze, dotyczące czasu pomiaru, limitów detekcji, precyzji badań. itd. które będzie realizował w części eksperymentalnej. Jestem pod wrażeniem czytając rozdział „cel pracy", że tak precyzyjnie zaplanowano doświadczenia.

Metodyka badań jest bardzo dobrze opisana, podane są wszystkie niezbędne detale metodyczne. Opracowano metodę oznaczania Pb, Cd i Sr w kościach poprzez optymalizację autorskiej procedury wytwarzania wzorców stałych w kościach przy użyciu prasy hydraulicznej. Do wytworzenia wzorców stałych zawierających powyższe pierwiastki wykorzystano Certyfikowane Materiały Odniesienia (CRM) oraz wzorzec NIST 1400 - Bone Ash (popiół kostny; National Institute of Standards and Technology, MD, USA). Do zapewnienia najwyższej jakości badań, wszystkie wzorce były przechowywane w odpowiednich warunkach, które zapewnił eksykator próżniowy. Ponadto zastosowano odpowiedni drobny sprzęt oraz aparaturę, szczegółowo opisane w rozprawie. Pomiary XRF w ramach rozprawy doktorskiej przeprowadzono przy użyciu przenośnego spektrometru XRF Niton XL3t GOLDD+ wyposażonego w lampę rentgenowską. Jak zaznacza Doktorant, dużym wyzwaniem było wybranie odpowiedniego pasma fluorescencji rentgenowskiej dla analizowanych pierwiastków. Procedury analityczne obejmowały trzy pomiary każdej próbki; każdy o czasie trwania 600 sekund, aby zapewnić wysoką precyzję. Aby zoptymalizować czas analizy przeprowadzono pomiary 2-gramowej próbki wzorca NIST 1400 z użyciem specjalistycznych kubków pomiarowych XRF. Bardzo dokładna metodyka stanowi gotową procedurę przygotowania wzorców kości. Przeprowadzono również walidację opracowanej techniki pXRF, koncentrując się na ocenie kilku wskaźników: precyzji, granicy wykrywalności (LOD), granicy oznaczalności (LOQ) oraz zakresu liniowości (współczynnik korelacji liniowej R), ważnych wskaźników dla zapewnienia dokładności i powtarzalności wyników w analizach chemicznych.

Wyniki i Dyskusja

Rezultaty rozprawy doktorskiej są przedstawione w dosyć zwięzły sposób, głównie w postaci tabel oraz wykresów i odpowiednio wyjaśnione w tekście. Natomiast Dyskusja otrzymanych wyników badań jest bardzo dokładna i wnikliwa, zawarta jest na 16 stronach rozprawy. Pan mgr inż. Damian Kobylarz optymalizował technikę wytwarzania odpowiedników kości o ściśle określonych stężeniach pierwiastków toksycznych i uzyskał w efekcie trójwymiarowe dyski odpowiadające strukturze kości człowieka, które zawierały wcześniej ustalone stężenia wybranych pierwiastków toksycznych: Pb, Cd i Sr. Autor zaobserwował, że uzyskane wyniki pomiarów zarówno dla Sr i Pb trwających 600 s były zdecydowanie bardziej zbliżone do certyfikowanych wartości i wszystkie pokrywały się z zakresem certyfikowanym w przeciwieństwie do wyników z pomiarów trwających 60 s. W wyniku pomiarów otrzymano krzywe kalibracyjne o bardzo dobrym współczynniku korelacji liniowej tj. odpowiednio dla Pb, Cd i Sr - RPb = 0,9999; RCd = 0,9959; RSr = 0,9998. Oznaczając badane pierwiastki uzyskano wysoką precyzję metody dla ołowiu, ale również dla kadmu i strontu, z wysoką zgodnością pomiędzy stężeniem kadmu, a sygnałem detektora w analizowanym zakresie stężeń. (Odpowiednio wykres 7 oraz wykres 8). Szczególnie ważne osiągnięcie Doktoranta, to fakt że w wyniku kompleksowej walidacji potwierdził, że opracowane metody spełniają rygorystyczne wymagania stawiane metodom używanym w dochodzeniach kryminalistycznych. Wszystkie opracowane metody charakteryzowały się względnymi błędami standardowymi na poziomie poniżej 5% co pozwoliło sklasyfikować je jako metody ilościowe.

Wnioski

W tej części pracy możne znaleźć szereg wniosków ujmujących w jedną całość i podkreślających najważniejsze wyniki uzyskane w pracy. Autor zrealizował założenia i idee pracy, które powyżej zostały opisane. Pomyślnie opracował metodę *in situ* oznaczania Pb, Cd i Sr w kościach za pomocą techniki pXRF na potrzeby laboratoryjnej toksykologii sądowej. Przeprowadzone badania wykazały, że granica wykrywalności (LOD) dla Pb wyniosła 2,01 μg/g, dla Cd 1,47 μg/g, a dla Sr 2,67 μg/g przy zastosowaniu trybu pomiaru "soils". Autorska metoda oparta o wybór odpowiednich pasm fluorescencji pozwoliła na uzyskanie jeszcze niższych wartości LOD co potwierdza wysoką czułość opracowanej metody. Metoda również charakteryzuje się wysoką powtarzalnością i wiarygodnością.

Doktorant opracował również procedury przechowywania wytworzonych wzorców do dalszych analiz oraz optymalny czas pomiaru. Pan mgr inż. Damian Kobylarz podkreślił we wnioskach, że opracowane metody charakteryzowały się wysoką precyzją w stosunku do oznaczanych pierwiastków co jest niezwykle ważne w wymaganiach procesowych, a ze względu na swoją przenośność może być stosowana w terenie np. podczas ekshumacji.

Metoda opracowana przez Doktoranta może dostarczyć pośrednich dowodów na temat przyczyny zgonu, a także na zasadzie "pierwiastkowego odcisku palca" służyć do rozróżniania kości z mogił zbiorowych. Stwierdzam, że wszystkie postawione tezy zostały zrealizowane w toku bardzo dobrze zaplanowanej części eksperymentalnej.

Generalnie, odnosząc się do całej rozprawy doktorskiej trudno w tej pracy znaleźć słabe strony. Z obowiązku recenzenta, muszę jednak zwrócić uwagę na niewielkie niedociągnięcia językowe i edytorskie w tym tzw. literówki.

W spisie treści str. 2 za mała czcionka- pkt. 5.4.1.1 - 5.4.1.3.

Zdanie nr 1 str. 3 - styl

Skrót BMD czyli gęstość mineralna kości jest wielokrotnie rozwijany np. str. 21, 26-wystarczy za pierwszym razem rozwinąć, a potem tylko stosować skrót.

Zdanie nr 2 - str. 45 powinno być akcesoriom zamiast akcesoria

Drobny błąd w legendzie osi odciętej na wykresie nr 1- powinno być zmierzona zamiast zmierozna

Numeracja podrozdziału 5.3.1. nieadekwatna do kolejności rozdziałów- str. 64

Rozdział Bibliografia - drobne błędy literowe oraz edytorskie

Ponadto w trakcie lektury Rozprawy Doktorskiej nasunęło mi się kilka pytań, a o udzielenie odpowiedzi na nie chciałabym prosić Doktoranta podczas publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

Mianowicie, czy znalazł Pan dla kadmu i strontu publikacje nt. badania tych pierwiastków w kościach *post mortem.* W rozprawie są zacytowane badania *post mortem* tylko dla ołowiu.

Przedstawiony na stronie 29 schemat działania spektroskopii jest opisany po angielsku, wydaje mi się że należałoby zastosować opisy w języku polskim, a ponadto w legendzie pod rysunkiem wyjaśnić np. skrót CPU.

Poszczególne sprzęty laboratoryjne w rozdziale "Materiał i metody" są sfotografowane i bardzo precyzyjnie opisane, mam wrażenie że nawet za szczegółowo. Z drugiej strony opis metod stanowi gotowe procedury, zatem można zrozumieć intencje Autora rozprawy.

Proszę wyjaśnić czy podpis wykresu nr 2 na str. 56 jest prawidłowy?
Brakuje mi następujących rozdziałów w rozprawie doktorskiej: spis skrótów oraz spis tabel i wykresów.
Pragnę podkreślić, że powyższe uwagi w żaden sposób nie umniejszają jakości i ważności przeprowadzonych badań.

Podsumowując recenzję uważam, że przedstawiona mi praca doktorska Pana mgr. inż. Damiana Kobylarza przygotowana pod opieką promotorów dr hab. Kamila Jurowskiego, prof. uczelni oraz dr Agaty Michalskiej stanowi oryginalne rozwiązanie problemów naukowych dotyczących opracowania tzw. białej metody *in situ* oznaczania wybranych pierwiastków toksycznych metodą pXRF w kościach na potrzeby laboratoryjnej toksykologii sądowej. Badania w tym zakresie stanowiły duże wyzwanie pod kątem koncepcyjnym jak i eksperymentalnym. Obejmowały one szereg kluczowych etapów mających na celu optymalizację i walidację nieniszczącej metody *in situ* oznaczania pierwiastków. Wielowymiarowy charakter tychże badań oraz kompleksowe opracowanie kilku metod w oparciu o różne strategie badawcze świadczy o dużej dojrzałości naukowej Doktoranta. Chciałabym jeszcze raz podkreślić, że opracowana przez Pana mgr. inż. Damiana Kobylarza metoda tworzenia wzorców kalibracyjnych ma istotne znaczenie dla toksykologii kryminalistycznej, gdzie liczy się precyzja i wiarygodność pomiarów stężeń pierwiastków śladowych, co jest kluczowe dla interpretacji dowodów. Przeprowadzone badania przyczyniają się do podniesienia standardów w tej dziedzinie.

Chciałabym jeszcze podkreślić wysoki dorobek naukowy Doktoranta, mimo bardzo młodego wieku. Pan mgr. inż. Damiana Kobylarz jest współautorem 8-miu artykułów opublikowanych w czasopismach o wysokim IF, a także brał czynny udział w konferencjach naukowych: 4 polskich i 1 międzynarodowej.

Sumaryczny IF: 46,4

Sumaryczna liczba punktów ministerialnych: 890 pkt.

Wniosek końcowy

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że praca doktorska Pana mgr. inż. Damiana Kobylarza spełnia warunki stawiane pracom doktorskim, podane w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.). W związku z tym wnoszę o dopuszczenie jej do publicznej obrony. Ponadto dysertacja za względu na wysoką wartość naukową i potencjał aplikacyjny zasługuje na wyróżnienie, o co niniejszym wnioskuję.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD TOKSYKOLOGII
adiunkt
10.12.2021r. Sawicka Ewa
dr hab. Ewa Sawicka