

Prof. dr hab. inż. Dorota G. Pijanowska  
Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. M. Nałęcz PAN  
ul. Księcia Trojdena 4, 02-109 Warszawa  
Tel.: +48 22 659 9143 w. 141  
Faks: +48 22 659 7030  
E-mail: dpijanowska@ibib.waw.pl

Warszawa, 20 sierpnia 2019r.

## **Recenzja rozprawy doktorskiej**

Tytuł rozprawy: „Oddziaływanie jonów żelaza, chromu i kobaltu z wybranymi strukturami biologicznymi”

Doktorantka: **mgr inż. Daria Głogocka**

Promotorzy rozprawy: Prof. dr hab. inż. Marek Langner  
Prof. dr hab. Martin Hof

Mgr inż. Daria Głogocka ukończyła studia magisterskie na Wydziale Podstawowych Problemów Techniki Politechniki Wrocławskiej. Badania związane z rozprawą doktorską były realizowane w Laboratorium Biofizyki Agregatów Makrocząsteczkowych, Katedra Inżynierii Biomedycznej Wydziału Podstawowych Problemów Techniki PWr pod kierunkiem dwóch promotorów prof. dr hab. inż. Marka Langnera i prof. dr hab. Martina Hofa.

### TEMATYKA PRACY

Tematyka rozprawy doktorskiej, w pewnym zakresie, jest związana, w szczególności poprzez możliwe wykorzystanie wyników badań, z dyscypliną inżynieria biomedyczna. Najogólniej ujmując, tematyka ta dotyczy badań nad opracowaniem metody pomiaru przestrzennego rozkładu jonów wybranych metali ciężkich występujących w stopach stosowanych do wytwarzania implantów tkanki kostnej. Recenzowana rozprawa doktorska wpisuje się w aktualny nurt badawczy związany z rozwojem metod wspomagających badania nad materiałami stosowanymi w implantologii, a w szczególności wpływu tych materiałów na tkankę. Zatem uzyskane wyniki mogą być wykorzystane w badaniach nad właściwościami materiałów metalicznych używanych w implantologii, które mogłyby wpłynąć na zmniejszenie występowalności częstych powikłań u pacjentów z takimi implantami, w postaci różnych schorzeń np. metalozy.

### STRUKTURA I ZAWARTOŚĆ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Przedłożona rozprawa doktorska zawiera 95 stron, obejmujące 10 rozdziałów, w tym streszczenie w języku polskim oraz 61 rysunki i 4 tabele. Rozprawa jest w postaci tradycyjnej monografii. Jednak brakuje wymaganego streszczenia w języku angielskim. Część pierwsza obejmuje wprowadzenie zawierające omówienie wpływu jonów metali ciężkich na organizm

człowieka i układów modelowych związane z rozkładem jonów metali ciężkich (podrozdziały 2.1-2.3). Druga część rozprawy jest poświęcona części eksperymentalnej zawiera spis materiałów i odczynników, opis metod wykorzystywanych w prowadzonych badaniach aparatury badawczej i opis metodyki badań (rozdziały 4 i 5) oraz analizę wyników badań (rozdział 6). Pozostała część pracy przedstawia: podsumowanie (rozdział 7) i spisy tabel i rysunków (rozdziały 8 i 9).

Bibliografię (rozdział 10), na którą składa się 152 pozycje literaturowe, z których duża część - 36 publikacji (ok. 24%) stanowią publikacje z ostatnich 5 lat (2014-2018). Przedstawiony przegląd literatury został dokonany na podstawie właściwie dobranych pozycji piśmiennictwa dotyczącego przedmiotu rozprawy.

W rozprawie zostały sformułowane 2 główne cele, ujmujące istotę badań: (cel 1) opracowanie metody oznaczania przestrzennego rozkładu jonów w tkance kostnej, (cel 2) określenie wpływu jonów metali ciężkich na procesy wewnątrzkomórkowe, przy czym ze względu na złożoność problemu wybrano dwa zagadnienia związane z opisem wpływu: (a) jonów metali ciężkich i czynników zatłaczających na termodynamikę roztworów soli istotnych w fizjologii komórki oraz (b) jonów metali ciężkich na transport wody przez dwuwarstwę lipidową.

Rozprawa została dobrze zorganizowana strukturalnie z dobrze przedstawionymi i omówionymi wynikami badań. Kolejne etapy rozprawy rozwijają się w sposób naturalny, pokazując jednocześnie plan eksperymentu i sposób rozumowania Doktorantki. Elementy pracy są logicznie powiązane, a ich zamieszczenie w tekście pracy jest uzasadnione.

Jak wspomniano wcześniej, w części 2. – doświadczalnej, omówiono stosowaną metodykę badań, włączając również podstawy dotyczące stosowanych metod pomiarowych. Metodyka użyta do osiągnięcia celu pracy została starannie przemyślana, doświadczenia ułożone we właściwej kolejności. W szczególności stosowano: spektroskopię emisyjną indukowaną laserowo, mikroskopię elektronową z detektorem EDS (ang. *energy dispersive X-ray spectroscopy* - spektroskopii dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego), izotermiczną kalorymetrię miareczkową do oznaczeń ciepła rozcieńczania soli i technikę zatrzymanego przepływu do badań kinetyki transportu cząsteczek naładowanych. Wyznaczano objętość próbki odparowanej i głębokość otworów powstałych na powierzchni tkanki kostnej podczas ablacji laserowej oraz przygotowano próbki z gipsu budowlanego, które wykorzystano do wyznaczenia krzywych kalibracyjnych.

W rozprawie przedstawiono wyniki badań dotyczące wpływu jonów żelaza, chromu i kobaltu ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$  i  $\text{Co}^{2+}$ ) na termodynamikę rozcieńczania soli istotnych w układach biologicznych ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{CaCl}_2$  i ich mieszanin). Stwierdzono, że obecność ww. jonów zwiększa się entalpia rozcieńczania biologicznie istotnych soli. Stwierdzenie to wskazuje, iż jony tych metali mogą zaburzać homeostazę płynów fizjologicznych. W kolejnych badaniach Doktorantka wykazała, że białka typu albumina i agregaty lipidowe nie wpływają na dalszą zmianę termodynamiki fazy wodnej wywołanej obecnością ww. jonów.

Nadrzędny cel postawiony podczas realizacji rozprawy został osiągnięty. Oryginalną część rozprawy stanowi opracowanie metody, na podstawie której można stwierdzić obecność wybranych jonów w próbkach rzeczywistych – tkance kostnej i ocenić ich rozkład przestrzenny, opartej na technice spektroskopii emisyjnej indukowanej laserowo LIBS (ang. *laser induced breakdown spectroscopy*).

Doktorantka uzyskała interesujące wyniki badań własnych, w tym miejscu podam tylko wybrane, najistotniejsze wyniki.

1. Opracowano metodę badania dyfuzji jonów w tkance kostnej, opartą na technice spektroskopii emisyjnej indukowanej laserowo LIBS, umożliwiającą wyznaczenie przestrzennego rozkładu jonów ( $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cr^{3+}$ ) uwolnionych z powierzchni implantu. Ustalono parametry pomiarowe, tj.: czas opóźnienia rejestracji widm emisyjnych, czas ekspozycji detektora, energię wiązki lasera, pozwalające na zoptymalizowanie stosunku sygnału do szumu.
2. W ramach rozprawy podjęto ważki problem kalibracji metody, umożliwiającej prowadzenie badań ilościowych. W tym celu Doktorantka podjęła się opracowania sposobu przygotowania próbek kalibracyjnych. Próbki te spełniają podstawowe wymagania: (1) mają pasma emisyjne poza zakresem częstotliwości charakterystycznych dla oznaczanych cząsteczek i (2) właściwości cieplne są zbliżone do właściwości próbek rzeczywistych (kości). Przygotowano próbki, stanowiące swego rodzaju fantomy kości, które zostały wykorzystane do wyznaczenia krzywych kalibracji służących do ilościowej oceny rozkładu jonów metali w tkance kostnej metodą spektroskopii emisyjnej indukowanej laserowo LIBS.
3. Przygotowanie procedury preparatyki kości, w celu uzyskania próbek tkanki kostnej.
4. Badania termodynamiki rozcieńczania soli istotnych w układach biologicznych ( $NaCl$ ,  $KCl$ ,  $CaCl_2$  i ich mieszanin) wskazują na zwiększona entalpię ich rozcieńczania w obecności jonów  $Fe^{2+}$ ,  $Cr^{3+}$  i  $Co^{2+}$  oraz brak wpływu na dalszą zmianę termodynamiki fazy wodnej ww. układów w obecności białka typu albumina i agregatów lipidowych.
5. Dodatkowo dzięki zmianie ciśnień osmotycznych na dwuwarstwie lipidowej zbadano wpływ jonów żelaza, chromu i kobaltu na przepuszczalność tej dwuwarstwy. Stwierdzono, że obecność ww. jonów powoduje zmianę organizacji dwuwarstwy lipidowej, powodując obniżenie jej przepuszczalności.
6. Niewątpliwą zaletą tej rozprawy jest przedstawienie wyników badań prowadzonych z wykorzystaniem próbek rzeczywistych w postaci materiału biologicznego pochodzenia zwierzęcego.

Ze względu na wartość aplikacyjną badania powinny być kontynuowane i rozszerzane. Przed ewentualną publikacją rozprawa wymagałaby starannej redakcji, uzupełnienia opisów wyników badań, pojawiają się w niej pewne drobne nieścisłości jak również niejasności, które skłaniają do pewnych pytań, a ja przedstawię je w uwagach krytycznych i edytorskich.

#### UWAGI KRYTYCZNE

1. W podsumowaniu rozprawy Doktorantka stwierdza, że określono oddziaływanie jonów w kości po ich uwolnieniu z powierzchni implantu i późniejsze efekty toksyczne w całym organizmie. Zastrzeżenie budzi druga część tego stwierdzenia dotycząca „efektów toksycznych w całym organizmie”, ponieważ rozprawa nie przedstawia badań w takim szerokim zakresie.
2. Str. 62 stwierdzono, iż rozkład wapnia, magnezu, fosforu jest równomierny na całej powierzchni (rys. 45 B-E). W powiązaniu z rys. 45 G stwierdzenie to wymaga komentarza.

3. Na rysunku 59 zamieszczono wielkości znormalizowane dane (rys. 59 C i D) natomiast nie podano względem jakiej wartości przeprowadzono tę normalizację.
4. Przygotowane próbki kalibracyjne do badań metodą LIBS stanowiące swego rodzaju fantom kości, wykonano z gipsu budowlanego, materiału, który ze względu na swoje zastosowanie ma dopuszczoną dużą tolerancję składu. Czy w związku z tym była sprawdzona powtarzalność przygotowanych próbek i czy rozważano użycie innego materiału? Czy docelowo ten materiał ma być używany do przygotowania próbek kalibracyjnych?
5. Kolejne pytanie jest związane z danymi przedstawionymi na rys. 37 rozprawy. Otóż, co spowodowało, iż jako górną granicę przyjęto liczbę 100 ablacji? Zwiększenie liczby ablacji może wyraźniej pokazaćby tworzenie się plateau powyżej 90 powtórzeń.
6. Podobnego uzasadnienia, jak w punkcie powyżej, wymagałby czas trwania eksperymentu (44 dni) związanego z inkubacją w wodzie próbek kości (rys. 40).
7. Na str. 39 znajduje się opis rysunku 39, w którym podano iż „punkty pomiarowe przybliżono funkcjami liniowymi...” – raczej do wyznaczenia krzywej kalibracji zastosowano model liniowy.
8. Kolejna uwaga, a właściwie wskazówka dotyczy opisu badań. Pełny opis wymaga podania liczby powtórzeń ( $n$ ) jak również informacji czy podane słupki błędów prezentują odchylenie standardowe czy błąd standardowy. Tych informacji brakuje na rysunkach 25, 26, 27, 36, 37, 39 i innych.
9. Na stronie 46 pojawia się termin „wachlarz” – który wymaga krótkiego aczkolwiek precyzyjnego rozwinięcia.
10. Na rys. 17 na prezentacji 3D otworu ablacyjnego (rys. 17 B) powinno być wskazane miejsce cięcia profilu (rys. 17 A).
11. Na koniec uwag krytycznych wymienię kilka nieścisłości terminologicznych znalezionych w rozprawie:
  - izotermiczna kalorymetria miareczkująca (str. 41) – powinno być miareczkowa,
  - naładowane cząstki (m.in. str. 44) – w tym przypadku powinno być cząsteczki,
  - matryca dla elementu (str. 55) – powinno być zależnie od kontekstu pierwiastka, jonu, cząsteczki.

### ***Uwagi redakcyjne***

Poniżej wymieniam niektóre z błędów/pomyłek stylistycznych, które występują w rozprawie.

Str. 46: „intensywność pasma emisyjnego” czy też „intensywność linii bazowej” i na str. 34 „intensywność widma” nie są właściwymi terminami. Intensywność – jest przeniesieniem z angielskiego, natomiast w języku polskim stosuje się termin natężenie promieniowania.

Str. 50: sformułowanie „oparty na analizie” powinno zastąpić niewłaściwe: „oparty o analizę”.

Str. 60 i inne: brakuje jednostek symbolu stopni w podawanej temperaturze ( $^{\circ}\text{C}$ ).

Na stronie 70 podano odniesienie do rys. 54 podczas gdy opis dotyczy rys. 55.

Na stronie 74 niepotrzebny rysunek drugi z kolei – jest to powtórzony rys. 58 zamieszczony na następnej stronie.



W przypadku obiektów policzalnych, takich jak: cząsteczki, komórki, powinno używać się „liczba” a nie „ilość” – np. na str. 55 (i w całej pracy). Ostatnia z uwag w formie przypomnienia również dotyczy całej pracy, otóż wielkości mianowane zapisuje się ze spacją pomiędzy liczbą i jednostkami (np. str. 39).

## PODSUMOWANIE

Podsumowując, recenzowana rozprawa jest opracowaniem, świadczącym o dużym zaangażowaniu Doktorantki w wykonanie czasochłonnych badań eksperymentalnych. Zatem Doktorantka wykazała się umiejętnym wykorzystaniem łączeniem wiedzy z różnych obszarów (chemii, biologii, biofizyki), oraz umiejętnościami umożliwiającymi właściwe przygotowanie próbek do badań i samych pomiarów.

Istotnymi wynikami o charakterze użytkowym i poznawczym przedstawionymi w rozprawie są: (1) opracowana metoda badania dyfuzji jonów w tkance kostnej, opartej na technice LIBS, umożliwiającej wyznaczenie przestrzennego rozkładu jonów ( $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cr^{3+}$ ) i przygotowanie odpowiednich próbek kalibracyjnych oraz (2a) wskazanie na zwiększoną entalpię rozcieńczenia soli istotnych w układach biologicznych (NaCl, KCl,  $CaCl_2$  i ich mieszanin) w obecności jonów  $Fe^{2+}$ ,  $Cr^{3+}$  i  $Co^{2+}$  oraz brak wpływu na dalszą zmianę termodynamiki fazy wodnej ww. układów w obecności białka typu albumina i agregatów lipidowych oraz (2b) stwierdzono, iż obecność ww. jonów powoduje zmianę organizacji dwuwarstwy lipidowej, powodując obniżenie jej przepuszczalności.

Badania wykonane z zastosowaniem opracowanej metody z wykorzystaniem próbek rzeczywistych, mogą posłużyć również do postawienia oceny i optymalizacji materiałów stosowanych do konstrukcji implantów kostnych.

## DOROBEK NAUKOWY DOKTORANTKI

Dorobek publikacyjny Doktorantki jest dobry. Doktorantka jest współautorką 5 artykułów opublikowanych w recenzowanych czasopismach z bazy *Journal Citation Report* (JCR): *EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES* (1 art.,  $IF^{2018} = 3,532$ ), *CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY LETTERS* (1 art.,  $IF^{2018} = 3,367$ ), *GENERAL PHYSIOLOGY AND BIOPHYSICS* (1 art.,  $IF^{2018} = 1,309$ ), *ACTA OF BIOENGINEERING AND BIOMECHANICS* (1 art.,  $IF^{2018} = 1,112$ ) i *OPTICA APPLICATA* (1 art.,  $IF^{2018} = 1,054$ ), cztery z nich, oprócz ostatniego, są artykułami związanymi z tematem rozprawy, z których w trzech mgr D. Głogocka jest 1. autorem, a w pierwszym z wymienionych jest drugim autorem. Sumaryczny współczynnik wpływu czasopism, w których zostały opublikowane wyniki badań wynosi 10,374.

Ponadto Doktorantka jest również pierwszą współautorką rozdziału zatytułowanego „Szczytce optyczne” w monografii *POSTĘPY INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ*.

## WNIOSEK KOŃCOWY

Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Darii Głogockiej spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim przez Ustawę o stopniach naukowych i tytule naukowym w zakresie sztuki z dn. 14 marca 2003 roku i w Ustawie "Prawo o szkolnictwie wyższym" z 18 lipca 2018 r. Zatem wnoszę o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Uwzględniając zakres pracy badawczej związanej z doktoratem oraz dorobek publikacyjny Doktorantki, którego główną częścią są 4 artykuły opublikowane w czasopismach z listy JCR o sumarycznym współczynniku wpływu wynosi 10,374, wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Slijanowski". The signature is fluid and cursive, with a long vertical stroke extending downwards from the end.