



dr hab. Barbara Wagner
Pracownia Teoretycznych Podstaw Chemii Analitycznej
Wydział Chemii
Uniwersytet Warszawski
Pasteura 1
02-055 Warszawa

Warszawa, 02.11.2017 r.

Recenzja pracy doktorskiej mgr Adama Sajnog

pod tytułem: *"Zastosowanie metody ablacji laserowej połączonej z ICP-MS do oznaczania i wizualizacji rozmieszczenia pierwiastków w miękkich tkankach ustrojowych"*

Przedłożona do recenzji praca doktorska mgr Adama Sajnog *"Zastosowanie metody ablacji laserowej połączonej z ICP-MS do oznaczania i wizualizacji rozmieszczenia pierwiastków w miękkich tkankach ustrojowych"* została wykonana w Pracowni Analizy Spektroskopowej Pierwiastków na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu pod opieką promotora prof. zw. dr hab. Danuty Barańkiewicz. Promotorem pomocniczym była dr Anetta Hanć. Opisane badania częściowo finansowane były w ramach grantu: NCN Preludium UMO-2015/N/17/ST4/03808 *„Ilościowa wizualizacja rozmieszczenia pierwiastków w miękkich tkankach ustrojowych z zastosowaniem techniki LA-ICP-MS”*.

Recenzowana praca doktorska dotyczy intensywnie rozwijanej tematyki badawczej związanej z możliwościami prowadzenia coraz bardziej szczegółowej diagnostyki zdrowia z zastosowaniem nowoczesnych metod instrumentalnych. Pan mgr Adam Sajnog swoje zainteresowania naukowe skupił na wykorzystaniu potencjału jednej z ciekawszych metod spektralnych: metodzie LA-ICP-MS, czyli spektrometrii mas z jonizacją w płamie indukcyjnie sprzężonej wykorzystującej zjawisko ablacji laserowej podczas etapu mikropróbkiowania próbek stałych.

W ostatnich latach metoda LA-ICP-MS zyskuje coraz większą popularność, gdyż po ponad 2 dekadach intensywnych badań podstawowych, jej skomplikowany charakter analityczny został już stosunkowo dobrze poznany i opisany. Rozpoznane zostały zalety tej metody oraz jej potencjalne ograniczenia, wynikające z procesów fizykochemicznych zachodzących na etapie pobierania materiału próbki, transportu uzyskanego aerozolu do plazmy, jonizacji, rozdzielania jonów względem stosunku m/z i detekcji. W pracy doktorskiej wszystkie etapy analizy z zastosowaniem metody LA-ICP-MS zostały wymienione i pokrótce scharakteryzowane, pozwalając na ogólne wprowadzenie do zagadnień oznaczania i wizualizacji rozmieszczenia pierwiastków w miękkich tkankach ustrojowych.

Tematyka pracy doktorskiej mgr Adama Sajnog znakomicie wpisuje się w nurt badań prowadzonych w Pracowni Analizy Spektroskopowej Pierwiastków kierowanej przez Profesor Danutę Barańkiewicz. W pracy naukowej tego zespołu można zaobserwować nurt fascynacji możliwościami analitycznymi nowoczesnych metod spektralnych z badaniami aplikacyjnymi, ukierunkowanymi na wielopierwiastkową, bezpośrednią



analizę próbek stałych, jednocześnie przy wyraźnym nacisku położonym na zachowanie zasad chemometrii i metrologii w całym procesie analitycznym. Jestem pod ogromnym wrażeniem staranności zaplanowania badań i systematycznego przeprowadzenia oraz udokumentowania wszystkich eksperymentalnych działań opisanych w recenzowanej pracy doktorskiej, w której dbałość o szczegóły techniczne samych pomiarów LA-ICP-MS towarzyszy celowości prowadzonych badań diagnostycznych oraz analizie chemometrycznej wszystkich uzyskanych wyników. Uważam, że praca doktorska mgr Adama Sajnog stanowi bardzo atrakcyjną ilustrację działań interdyscyplinarnych, w których analityczne badania poznawcze znajdują zastosowanie w badaniach z obszaru medycyny i diagnostyki klinicznej.

Struktura recenzowanej pracy doktorskiej jest klasyczna, z zachowaniem tradycyjnego podziału na część teoretyczną (4 rozdziały, 38 stron) i eksperymentalną (4 rozdziały, 73 strony). Pracy towarzyszy bogata bibliografia obejmująca 155 pozycji literaturowych z uwzględnieniem najważniejszych prac dotyczących opisywanej tematyki badawczej oraz najnowszych publikacji, ukazujących postęp, jaki dokonał się w tej dziedzinie badań. Całość zamyka streszczenie napisane po polsku i po angielsku oraz życiorys wraz ze spisem dorobku naukowego Doktoranta. Do pracy dołączona została specjalna wkładka, na której znalazł się wykaz akronimów spotykanych w tekście.

W **części teoretycznej** zdecydowanie na wyróżnienie zasługuje stworzenie listy prac badawczych omawiających analizę próbek klinicznych metodą LA-ICP-MS zaprezentowane w Tabeli 2 (str.29-36). To wielostronicowe, tabelaryczne zestawienie obejmuje szereg istotnych, opublikowanych do tej pory informacji, uporządkowanych w taki sposób, aby ułatwić porównanie:

- badanych tkanek (próbka: rodzaj próbki/badana próbka);
- oznaczanych w nich izotopów i wyboru wzorca wewnętrznego (analizy: mierzone izotopy/wzorec wewnętrzny);
- stosowanej aparatury (aparatura: ICP-MS (rozdzielczość $m/\Delta m$ /rodzaj i parametry pracy lasera);
- parametry metody analitycznej (LOD, LOQ, liniowość, precyzja, odzysk);
- właściwość wyniku pomiaru (CRM, roztwory wzorcowe).

Sądzę, że tabela ta jest skarbnicą podstawowych informacji dla każdego, kto zainteresuje się prowadzeniem badań metodą LA-ICP-MS i oznaczaniem zawartości wybranych pierwiastków w jakichkolwiek próbkach klinicznych. Stanowi także ważne wprowadzenie do części eksperymentalnej, gdyż zawarte w tej tabeli dane można uznać za punkt odniesienia dla badań przeprowadzonych w ramach recenzowanej pracy doktorskiej.

Opis badań: Badania opisane w pracy doktorskiej mgr Adama Sajnog skupiały się na możliwości wskazania optymalnych warunków oznaczania wybranych pierwiastków (m.in. Ti, Al i V) w wycinkach błony śluzowej jamy ustnej pacjentów poddanych zabiegowi implantacji. Materiał próbek pobierany był w gabinetach stomatologicznych od pacjentów poddanych zabiegom wstawiania tytanowych implantów. Jako metodę badawczą Doktorant wybrał LA-ICP-MS i przeprowadził szczegółowy proces optymalizacji całej procedury analitycznej, poczynając od sposobu przygotowania próbek błony śluzowej, wybór i sposób przygotowania



odpowiednich wzorców o dopasowanej matrycy, do matrycy próbek. Opisy wszystkich etapów procedury pomiarowej są w pracy przedyskutowane ze stosowną detalicznością. Wybór każdego parametru pracy układu do ablacji laserowej (m.in. energia i częstotliwość pracy lasera, średnica obszaru poddanego ablacji na powierzchni próbki, szybkość skanowania próbki) jest sprawdzony i logicznie opisany, z podaniem pełnego uzasadnienia dokonanego wyboru. Optymalizacja spektrometru mas została również zaprezentowana w sposób jak najbardziej profesjonalny i czytelny, pokazując znakomite przygotowanie Doktoranta do prowadzonych badań.

Dyskusja wyników jest wzorcowo poprzedzona opisem procedury kalibracji i sprawdzeniem potencjalnych interferencji. Dla pomiarów ilościowych prowadzonych metodą LA-ICP-MS istotne jest dokonanie wyboru nie tylko wzorców zewnętrznych (o matrycy jak najbardziej dopasowanej do analizowanych próbek), bardzo ważny pozostaje wybór tzw. wzorca wewnętrznego, spełniającego rolę niejako odnośnika ilości materii uzyskanej w wyniku ablacji. Temu zagadnieniu zostało poświęcone stosowne wyjaśnienie, pokazujące zasadność dokonanego ostatecznie wyboru, czyli izotopu ^{34}S , który został wyselekcjonowany, po sprawdzeniu pozostałych potencjalnych kandydatów do pełnienia tej roli: ^{13}C , ^{26}Mg i ^{43}Ca .

Obserwacje mikroskopowe pozwoliły na udokumentowanie poprawności przyjętej procedury mikropróbkowania – zastosowanie profilometrii optycznej (Rys.38/str.80) umożliwia poznanie głębokości ablacji, a dołączone zdjęcia SEM (Rys.39/str.81) uzupełniają dokumentację fotograficzną dotyczącą podobieństwa zachowania się wzorców i próbek błony śluzowej jamy ustnej pod wpływem wiązki promieniowania laserowego.

Walidacja metody analitycznej w jednoznaczny sposób ukazuje poprawność przyjętych rozwiązań analitycznych. Dyskusja tego etapu pracy została poprowadzona dla opracowanych procedur z uwzględnieniem szeregu parametrów, wśród których między innymi znalazły się: zakres krzywej kalibracyjnej ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$); współczynnik korelacji (R); - powtarzalność (%); instrumentalna granica wykrywalności ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$); granica wykrywalności metody ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$); odzysk dodatku analitu (%); precyzja pośrednia (%). Na uwagę zasługuje więcej niż zadowalająca dokładność oznaczeń Mg, Ca, Zn i Cu w materiale CRM ERM-BB422 Fish Muscle (Tabela 7/str.85) uzyskana przy zastosowaniu procedur oznaczonych jako procedura 1 i procedura 2, oraz naprawdę zadowalająca dla wybranych pierwiastków (poza Cu) w materiale CRM ERM-BB184 Bovine Muscle (Tabela 10/str.87). Krytyczne podejście do wyników własnych badań znalazło odzwierciedlenie w komentarzu zamieszczonym na str.88 do liniowości krzywych kalibracyjnych wyznaczonych dla poszczególnych pierwiastków: *„Najlepszą liniowością charakteryzowała się procedura nr 1 gdzie wartości parametru R były większe od 0,9999. Równie dobre wartości stwierdzono dla procedury nr 2, gdzie wartości parametru R mieściły się w zakresie 0,9997-0,9999. Liniowość krzywych kalibracyjnych w procedurze nr 3 była nieco gorsza, ale akceptowalna, i mieściła się w zakresie 0,9968-0,9999 dla wszystkich analizowanych pierwiastków.”* Pozwolę sobie w tym miejscu zaznaczyć, że są to dane uzyskane dla próbek stałych, poddanych bezpośredniej analizie. Nazwanie wartości współczynnika korelacji (R) bliskiego wartości 1.0000



wartościami jedynie akceptowalnymi jest wyraźnym niedocenieniem uzyskanych wyników, tym bardziej, że dotyczy analizy wzorców zaproponowanych i przygotowanych przez Autora rozprawy.

Najbardziej smakowita estetycznie część pracy doktorskiej pana mgr Adama Sajnog dotyczy wizualizacji sposobu rozmieszczenia pierwiastków (Ti, Al, V), które wraz z materiałem implantów mogą zostać wprowadzone do organizmu człowieka poprzez błony śluzowe jamy ustnej. Wyniki analiz zostały przedstawione w postaci kolorowych map odzwierciedlających heterogeniczność badanych próbek wywołaną przechodzeniem cząstek materiału implantów do tkanek miękkich. Wykresy prezentowane na stronach 95-117, które wydają się stanowić jedynie łatwą ilustrację przeprowadzonych pomiarów LA-ICP-MS, doceniam w sposób szczególny. Są one tak oczywiste dla czytelnika, gdyż są wynikiem przemyślanego sposobu prezentowania wyników, staranności doboru skali map i czytelności opisów. Zaprezentowane dla 3 procedur analitycznych mapy są wynikiem działań obliczeniowych i edytorskich, o których wiem, że są czasochłonne, ale zazwyczaj niedoceniane, pomimo ogromu pracy koncepcyjnej, jakiej wymagają. Wszystkie mapy zaprezentowane w pracy potwierdzają tendencję do przechodzenia materiału implantów do błony śluzowej. Ostateczne zoptymalizowanie warunków pomiarowych metody LA-ICP-MS w procedurze 3, umożliwiło przeprowadzenie obserwacji z najwyższą rozdzielczością powierzchniową, spośród zaproponowanych procedur analitycznych. Na podstawie wszystkich opisanych badań udało się stwierdzić, że nagromadzenie oznaczanych pierwiastków związane jest z w obecnością cząstek metalicznych o rozmiarach nawet niekiedy rzędu 100 μm . Najprawdopodobniej pojawiają się one podczas samego zabiegu implantacji, choć wielce prawdopodobne wydaje się również to, że mogą uwalniać się w wyniku korozji już zainstalowanego implantu w jamie ustnej. Dalsze analizy próbek klinicznych związane ze szczegółowymi badaniami błony śluzowej zapewne byłyby wielce wskazane, pozwalając na kontynuację owocnej współpracy na pograniczu chemii analitycznej i stomatologii.

Praca doktorska pana mgr Adama Sajnog została napisana bardzo profesjonalnie i starannie, jednak Doktorant nie ustrzegł się pewnych niezręczności językowych. W tytule pracy znajduje się ogólne sformułowanie określające metodę LA-ICP-MS jako metodę „*ablacji laserowej połączonej z ICP-MS*”, jednak potem (str. 4, 6, 8, 118), kilkakrotnie pojawia się „*ablacja laserowa z detekcją w spektrometrze mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie*” lub „*ablacja laserowa z detekcją ICP-MS*”, co uważam za drażniącą próbę rozwinięcia nazwy. Metoda LA-ICP-MS wykorzystuje trzy główne etapy, jakie musi przebyć próbka podczas analizy: etap pobrania materiału do analizy (LA: ablacja laserowa); etap przeprowadzenia atomów do postaci jonów (ICP: jonizacja w plazmie) i po stosownym rozdzieleniu jonów – etap detekcji (MS: detekcja poszczególnych izotopów). Z tego względu doradziłabym stosowanie pełnej nazwy tej metody. Proponuję także zastąpienie słowa „*abundacja*” (str. 15 i 17) bardziej opisowym, ale poprawnym polskim sformułowaniem „*naturalna zawartość w przyrodzie*”. Według mnie powinno się unikać używania określenia „*rozkład analitu*” (str.17) dla rozmieszczenia powierzchniowego analitu.



W części teoretycznej Doktorant prezentuje opis zjawisk, które z różną intensywnością mogą towarzyszyć ablacji laserowej. Wśród opisywanych zjawisk znalazł się opis frakcjonowania. Poza wymienionymi na str.14 sposobami ograniczenia wpływu ablacji na wyniki analiz LA-ICP-MS tkanek miękkich istnieje jeszcze możliwość stosowania ablacyjnych komór kriogenicznych, której mi zabrakło pomimo tego, że z literaturowych wydaje się bardzo skuteczny. Natomiast nie wydaje mi się do końca zasadne rozróżnienie sposobu a) i b) jako dwóch odrębnych punktów. Prosiłabym o wyjaśnienie różnicy pomiędzy zastosowaniem kalibracji opartej o wzorce jak najbardziej zbliżone składem i strukturą do próbki badanej i CRM o zbliżonej matrycy do matrycy próbki (czy w tym drugim wypadku, nie jest to raczej sposób udokumentowania jakości wyników oznaczeń ilościowych?).

Również na str.14 znajduje się sformułowanie dosyć niesprawiedliwie unifikujące zachowanie większości pierwiastków w plazmie. Zabrakło mi większej dyskusji tego w jaki sposób zróżnicowanie wartości pierwszych potencjałów jonizacji może wpływać na czułość pomiarów LA-ICP-MS, szczególnie w kontekście późniejszego dokonania wyboru izotopu ^{34}S jako wzorca wewnętrznego. Pozostając przy dokonywaniu wyboru wzorca wewnętrznego, proszę o wyjaśnienie konieczności wyznaczania zawartości wzorca wewnętrznego innymi metodami analitycznymi przed podjęciem badań LA-ICP-MS.

Dlaczego w Tabeli 1 (str.15) zabrakło izotopu ^{24}Mg ? Może już w tym miejscu warto było pokusić się o oszacowanie prawdopodobieństwa pojawienia się konkretnych interferencji spośród tych, które potem stanowiły przedmiot eksperymentów opisanych na str.67 ?

Przyjęte zasady doboru optymalnych warunków pomiarów LA-ICP-MS zostały przedstawione na str.57. Intuicyjnie zgadzam się z zaprezentowanym opisem, jednocześnie uważam, że w pracy naukowej z obszaru nauk ścisłych takie ustalenie dla jakichkolwiek parametrów wartości granicznych opartych na określeniu „wystarczająca intensywność”, „wystarczająca rozdzielczość przestrzenna” oraz „niezbyt długi czas analizy” nie jest godne aprobaty i wymagałoby podjęcia próby bardziej racjonalnego opisu. W recenzowanej pracy „rozdzielczość przestrzenna” (str. 10, 12, 57, 93, 101 i 110) stosowana jest dla określenia „rozdzielczości powierzchniowej”. Stworzone mapy wizualizują dwuwymiarowe rozmieszczenie wybranych pierwiastków w badanych tkankach i nie pozwalają na stworzenie modelu 3-D, pomimo tego, że takie prace opisujące zastosowanie metody LA-ICP-MS są znane.

Wyniki badań prowadzonych przez mgr Adama Sajnog zostały opublikowane w 6 czasopismach z listy Filadelfijskiej o znacznym współczynniku oddziaływania. Pan mgr Adam Sajnog jest pierwszym autorem dwóch z tych publikacji, a także kolejnych 6 prac, które ukazały się w czasopismach o zasięgu krajowym. Doktorant brał aktywny udział w wielu konferencjach krajowych i zagranicznych, na podkreślenie zasługuje także jego działalność organizacyjna i umiejętność skutecznego ubiegania się o granty naukowe. W 2016 roku rozpoczął kierowanie projektem finansowanym przez NCN (Preludium UMO-2015/N/17/ST4/03808). Wśród nagród otrzymanych dotychczas przed pana mgr Adama Sajnog na szczególne podkreślenie zasługują



UNIwersYTET WARSZAWSKI
WYDZIAŁ CHEMII



nagrody zespołowe III stopnia za osiągnięcia naukowe przyznana przez Rektora UAM w latach: 2015, 2016 i 2017 oraz uzyskanie stypendium naukowego w roku akademickim 2014/2015.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.), dlatego przedkładam wniosek do Rady Naukowej Wydział Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr Adama Sajnog do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Połączenie badań interdyscyplinarnych prowadzonych na pograniczu dwóch dziedzin: chemii analitycznej i medycyny jest niezwykle skomplikowane. W tym trudnym obszarze badań pan mgr Adam Sajnog potrafił się znakomicie odnaleźć, proponując nowe rozwiązania analityczne, które z pełnym sukcesem udało się zastosować w badaniach poznawczych z zakresu stomatologii. Wyniki badań opisanych w przedłożonej pracy doktorskiej, a szczególnie zaproponowanie wzorców stałych dopasowanych matrycowo do analizowanych próbek i zastosowanie w tym celu matrycy sproszkowanego białko jaja kurzego uważam za nowatorski pomysł, dlatego wnioskuję o wyróżnienie zaprezentowanej pracy.


dr hab. Barbara Wagner