



dr hab. Alina T. Dubis, prof. UwB
Uniwersytet w Białymstoku
Wydział Chemii

Białystok, 2023-07-03

Recenzja
rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Wójtowicz, zatytułowanej
**„Nowoczesne technik analizy materiału biologicznego w zastosowaniach toksykologiczno-
sądowych”**

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w trakcie realizacji Studiów Doktoranckich w ramach projektu badawczego NCN Opus 19 „Innowacyjne podejście do badań dystrybucji *ante-mortem* oraz redystrybucji *post-mortem* substancji psychoaktywnych w tkankach ludzkich – od modelu zwierzęcego do przypadku analizy tkanek ludzkich”, Sonata Bis 6 „Toksykinetyka ksenobiotyków w ludzkich tkankach: zintegrowane badania nad zachowaniem substancji psychoaktywnych w szpiku kostnym i alternatywnych materiałach sekcyjnych” a ponadto w ramach programu NAWA im. Iwanowskiej „Development of new methods for biological stain analysis for forensic purposes using vibrational spectroscopy and advanced statistics”

Rozprawa doktorska została wykonana w Zakładzie Chemii Analitycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie pod kierunkiem naukowym dr hab. Renaty Wietecha-Postuszny, prof. UJ specjalistki z zakresu analiz sądowych i klinicznych.

Praca doktorska mgr Anny Wójtowicz została przygotowana według klasycznego schematu. Obejmuje 229 stron i zawiera część literaturową, część doświadczalną, podsumowanie, wnioski, bibliografię stanowiącą 213 bieżących pozycji literaturowych oraz wykaz publikacji i osiągnięć autorki. W wykazie cytowanej literatury znajduje się pięć publikacji związanych z tematem rozprawy doktorskiej, których współautorką jest Pani mgr Anny Wójtowicz. Należy podkreślić, że w czterech pracach Pani Anna Wójtowicz jest pierwszym autorem. Prace obejmujące tematykę prezentowaną w rozprawie doktorskiej zostały opublikowane w bardzo dobrych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, których łączna liczba punktów MEN wynosi 490 (IF=29,28). Na podkreślenie zasługuje fakt, że doktorantka jest współautorką pięciu innych publikacji naukowych o łącznej liczbie punktów MEN 550 (IF=18,59) oraz współautorką rozdziału w książce „Analityka Sądowa” wydawnictwa PWN i publikacji pokonferencyjnej „Proceedings of the 17th International Student Conference - Modern Analytical Chemistry”.

Rozprawa doktorska poświęcona jest opracowaniu nowych, innowacyjnych metod identyfikacji zmian zachodzących w składzie biochemicznym i składzie oraz zawartości ksenobiotyków w matrycach biologicznych w czasie i opracowaniu modelu obserwowanych procesów.

Ze względu na to, że współczesna wiedza dotycząca ustalenia czasu zgonu na podstawie analizy znalezionych śladów biologicznych jest niewystarczająca, doktorantka podjęła próbę poszukiwania skutecznych i szybkich metod interpretacji wyników analizy złożonych matryc biologicznych i próbę oceny zmian chemicznych zachodzących w matrycy wraz z wpływem czasu.



UNIWERSYTET W BIAŁYMSTOKU

Wydział Chemii



15-245 Białystok, ul. Ciołkowskiego 1K, ☎ (+48-85) 738-8034; e-mail: alina@uwb.edu.pl

Badania obejmowały analizę zmian składu próbek biologicznego stanowiących potencjalny materiał do analizy sadowej. Materiał ten stanowiła krew menstruacyjna, ciało szkliste oka, oraz płyny ustrojowe homogenat wątroby.

Próbki krwi menstruacyjne doktorantka uzyskała od dwóch dawczyń rasy kaukaskiej, w trakcie pobytu na stypendium NAWA na Uniwersytecie w Albany (USA). W celu analizy płynów ustrojowych i tkanek pochodzących z różnych narządów, zostały zakupione króliki a eksperymenty z ich udziałem prowadzono w Zwierzętarni Ośrodka Medycyny Eksperymentalnej i Innowacyjnej Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie.

Doktorantka przeprowadziła również eksperymenty wstępne w celu zbadania stabilności matrycy. Materiałem badawczym były próbki ciała szklistego oka ludzkiego dostarczone przez ZMS UM we Wrocławiu. Należy podkreślić, że doktorantka uzyskała zgodę Komisji Bioetycznej. W kolejnym eksperymencie dotyczącym stabilności matrycy wykorzystywała próbki ciała szklistego cieląt. Pobrany materiał biologiczny doktorantka wykorzystwała do badań stabilności wybranych ksenobiotyków będących najpopularniejszymi substancjami psychotropowymi. W drugim etapie badań doktorantka dokonała statystycznej analizy wyników w celu zaproponowania modelu zmian pośmiertnych w płynach ustrojowych i w tkankach narządów.

W części literaturowej, podzielonej na dwa podrozdziały, Pani Anna Wójtowicz dokonała charakterystyki materiału biologicznego najczęściej poddawanego badaniom toksykologiczno-sadowym. Autorka zwróciła uwagę na ograniczenia analityczne spowodowane złożonym składem matryc biologicznych oraz wpływem licznych czynników na zmiany zachodzące w matrycach biologicznych. Doktorantka odwołała się do literatury fachowej autorstwa światowej sławy kryminalistyka dr Henry Lee „Henry Lee’s Crime Scene Handbook”.

Szczególne uwagę doktorantka zwróciła na zalety takiej matrycy jak ciało szkliste ze względu na prosty skład matrycy i bark szeregu enzymów grupy esteraz, co umożliwia oznaczenia jakościowe i ilościowe szeregu substancji psychoaktywnych. Ponadto doktorantka zauważyła, że ta matryca biologiczna wykorzystywana była w identyfikacji czasu jaki upłynął od śmierci poprzez oznaczenie poziomu potasu oraz analizę wzrostu intensywności pasma amidowego II. Równie cenną matrycą stosowaną w szacowaniu czasu zgonu jest wątroba. Analizy MS i FTIR dostarczają cennych informacji o zmianie w składzie białek i ze wspomaganie analizy statystycznej dokonuje się szacowania czasu zgonu.

Doktorantka w następnym podrozdziale części teoretycznej omówiła metody instrumentalne analizy materiału biologicznego w badaniach toksykologiczno-sadowych. Pani Anna Wójtowicz wypuściła zalety technik odbiciowych w podczerwieni, które umożliwiają bezpośrednią analizę próbek. Wskazała możliwości wykorzystania w analizie biocząsteczek spektroskopii Ramana przy wzbudzeniu promieniowaniem laserowym z zakresu UV. Doktorantka sięgnęła po przykłady wykorzystania fluorescencji i technik separacyjnych w analizach materiału biologicznego.

W kolejnym podrozdziale części teoretycznej autorka omówiła współczesny stan wiedzy dotyczący badań stabilności składu matrycy i stężeń ksenobiotyków. W ostatnim rozdziale części teoretycznej Pani Wójtowicz przedstawiła zastosowania metod analizy matematycznej i statystycznej do wyodrębnienia istotnych informacji z wielowymiarowych zestawów danych, które otrzymuje się w trakcie analizy spektroskopowej IR czy Ramana połączonych z obrazowaniem. Doktorantka podała



UNIwersytet w Białymstoku

Wydział Chemii



15-245 Białystok, ul. Ciołkowskiego 1K, ☎ (+48-85) 738-8034; e-mail: alina@uwb.edu.pl

przykłady literaturowe zastosowania analizy chemometrycznej w badaniach identyfikacyjnych płam krwawych o różnym pochodzeniu.

Podsumowując moją ocenę Części teoretycznej, mogę stwierdzić, że została ona przygotowana logicznie i kompletnie, co świadczy o bardzo dobrej znajomości aktualnego stanu wiedzy dotyczącego metod analitycznych badania matryc biologicznych do celów toksykologiczno-sądowych oraz zmian w składzie ksenobiotyków w tych matrycach. Dobre rozeznanie literaturowe oraz dobrze uzasadnia celowość podjętych badań wskazuje, że Doktorantka jest bardzo dobrze przygotowana do prowadzenia prac eksperymentalnych i osiągnięcia założonych celów badawczych pracy.

Celem pracy Pani mgr Anna Wójtowicz było opracowania innowacyjnych metod identyfikacji zmian zachodzących w czasie w składzie biochemicznym matryc biologicznych oraz w składzie zawartości ksenobiotyków w matrycach. Doktorantka wzięła pod uwagę zmiany składu biochemicznego płam krwi menstruacyjnej, ciała szklistego oka i homogenatu wątroby stosując techniki spektroskopowe takie jak spektroskopia FTIR, Ramana, transmisyjne obrazowanie ramanowskie oraz fluorescencję, i analizę LC-MS ksenobiotyków. W ocenie recenzenta założone cele rozprawy bardzo dobrze odpowiadają na zapotrzebowanie na identyfikację zmian zachodzących w złożonych matrycach biologicznych. W przypadku zdarzeń ze skutkiem śmiertelnym wybór odpowiednich matryc i narzędzi analitycznych może umożliwić prawidłowe wnioskowanie o przebiegu zdarzenia.

W części eksperymentalnej dysertacji doktorantka przedstawiła opis materiału biologicznego i procedurę przygotowania próbek do analizy. Próbki krwi menstruacyjnej pozyskano od dwóch dawczyń rasy kaukaskiej w ramach realizacji stypendium w Programie im. Iwanowskiej, Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej na Uniwersytecie w Albany (USA). Próbki ciała szklistego oka zostały otrzymane z ZMS UM we Wrocławiu, a próbki ciała szklistego cieląt uzyskano z zakładu mięsnego Laskopol. Natomiast wątroba do sporządzenia homegentów pochodziła ze masarni. Próbki do badań stabilności matrycy badane były bezpośrednio po pobraniu oraz po odbiactaniu. Doktorantka testowała wpływ różnych warunków temperaturowych i środowiskowych przez okres 30 dni.

W dalszej części pracy doktorantka badała stabilność ksenobiotyk w matrycy biologicznej przy pomocy techniki SPME- LC-MS. Jako anality doktorantka wybrała 15 najczęściej spotykanych w analizach sądowych substancji psychotropowych. Jako wzorce wewnętrzne zostały użyte ich deuterowane pochodne. Doktorantka dokonała również analizy pośmiertnej płynów ustrojowych oraz tkanek i narządów pobranych od królików, przy pomocy obrazowania FTIR i spektroskopii Ramana przy wzbudzeniu laserem z zakresu ultrafioletu. Eksperyment zwierzęcy przeprowadzono w Ośrodku Medycyny Eksperymentalnej i Innowacyjnej Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie.

Pani Anna Wójtowicz stwierdziła na podstawie spektroskopii fluorescencyjnej, że ekspozycja krwi menstruacyjnej na warunki zewnętrzne powoduje zmiany zawartości endogennych fluoroforów w badanych próbkach krwi menstruacyjnej. Zaproponowana przez doktorantkę metoda detekcji NADH, FAD oraz flawin może posłużyć jako uniwersalna metoda datowania śladów krwawych. Doktorantka na podstawie badań rozproszenia ramanowskiego stwierdziła, że skomplikowana i niejednorodna matryca krwi menstruacyjnej uniemożliwia zbudowanie modelu datowania płam krwawych na podstawie zmiany intensywności poszczególnych pasm ramanowskich. Z tego względu doktorantka zbudowała model PLS-DA określania TSD, wykazujący 90% czułość i dokładność klasyfikacji próbek, pozwalający dokonać rozróżnienia płam świeżych i starszych.



UNIWERSYTET W BIAŁYMSTOKU

Wydział Chemii



15-245 Białystok, ul. Ciołkowskiego 1K, ☎ (+48-85) 738-8034; e-mail: alina@uwb.edu.pl

Doktorantka wykorzystała spektroskopię ATR-FTIR do monitorowania zmian biochemicznych zachodzących w czasie przechowywania ciała szklistego oka i homogenatu wątroby. Zmiany zachodzące w matrycach powiązane z autolizą między innymi białek, polisacharydów, kwasów nukleinowych czy fosforanów oraz syntezą nowych białek i lipidów następujących w wyniku działania bakterii gnilnych.

W dalszej części pracy doktorantka opracowała metodę badania stabilności ksenobiotyków w matrycy biologicznej VH i LH, wykorzystując technikę SPME/LC-MS. Na tej podstawie dokonała klasyfikacji badanych substancji psychoaktywnych na cztery grupy o różnej stabilności analitu. Bazując na nowoczesnym podejściu do analityki medycznej doktorantka dokonała oceny metody w oparciu o zasady nowoczesnej białej chemii analitycznej stwierdzając, że odznacza się ona wysokim stopniem zrównoważenia pomiędzy wydajnością analityczną, przyjaznością dla środowiska i praktycznością. Należy podkreślić że badania te były pionierskie ponieważ obejmowały szeroką grupę substancji psychotropowych i różne warunki temperaturowe a ich rezultaty zostały opublikowane w *Anal. Bioanal. Chem* w 2022 roku.

W kolejnym etapie pracy Pani Anna Wójtowicz przeprowadzała badania ATR-FTIR zmian pośmiertnych w tkankach i podjęła próbę skorelowania wyników z PMI stwierdzając, że ciało szkliste oka wykazuje najlepszą korelację obserwowanych zmian widmowych z okresem pośmiertnym. Stwierdzała, że pasma związana z degradacją białek mogą być markerami zmian pośmiertnych w matrycy VH. Zastosowana analiza chemometryczna HCA i PCA wskazuje na możliwość jednoznacznego rozróżnienia próbek pobranych bezpośrednio po śmierci i po 24 h od zgonu.

W kolejnym etapie pracy doktorantka kontynuowała badania zmian pośmiertnych w płynach ustrojowych i tkankach narządów wykorzystując obrazowanie FTIR. Badania te dostarczyły informacji o dystrybucji składników w tkankach wątroby. Grupowanie metodą HCA wskazało grupę zawierającą polisacharydy oraz białka. Doktorantka stwierdzała że najsilniejsze zmiany pośmiertne zachodzą w klasie polisacharydów wskazując, że zmiany pośmiertne rozpoczynają się od krawędzi tkanki.

W ostatnim etapie pracy doktorantka podjęła badania ramanowskie zmian pośmiertnych w próbkach wątroby króliczej w celu opracowania metody ustalania PMI. Badania prowadzone były przy użyciu fali wzbudzającej 199 i 239 nm. Na bazie stosunku intensywności pasm amidowych I i modelu klasyfikacji PLS-DA stwierdzono degradację pośmiertną białek. To podejście, dotychczas nieopisane w literaturze fachowej, okazała się dobrą metodą analityczną do monitorowania zmian biochemicznych w próbkach wątroby.

W mojej ocenie część doświadczalna została zaprojektowana bardzo logicznie, przeprowadzona starannie i opisana przejrzysto, umożliwiając dokładne śledzenie eksperymentu. Podsumowanie badań i wnioski końcowe są trafne. Wyniki badań uzyskanych przez doktorantkę oceniam bardzo wysoko. Za najważniejsze osiągnięcia kandydatki uważam:

Opracowanie modelu datowania plam krwi menstruacyjnej z wykorzystaniem spektroskopii fluorescencyjnej i ramanowskiej ze wzbudzeniem przy pomocy światła widzialnego. Osiągnięcia te zostały opublikowane w *Spectrochimica Acta A Mol. Biomo. Spectr.* 2021. i *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology* w 2021 r.

Opracowanie metody monitorowania stabilności ciała szklistego oka i homogenatu wątroby w trakcie przechowywania próbek przed analizą przy wykorzystaniu techniki ATR-FTIR. Osiągnięcia te opublikowane zostały w *Trends Analyt. Chem.* w 2020 r. i w *Monatshefte für Chemie – Chemical Monthly* w 2021



15-245 Białystok, ul. Ciołkowskiego 1K, ☎ (+48-85) 738-8034; e-mail: alina@uwb.edu.pl

Opracowanie warunków monitorowanie metodą SPME/LC-MS szerokiej grupy psychoaktywnych ksenobiotyków istotnych z punktu widzenia analiz sadowych. Osiągnięcia te opublikowane zostały w *Analytical and Bioanalytical Chemistry* w 2022 r.

Opracowanie modelu klasyfikacji trzech okresów pośmiertnych na podstawie zmian biochemicznych płynów ustrojowych i tkanek narządów przy zastosowaniu spektroskopii ramanowskiej ze wzbudzeniem laserem z zakresu UV.

Dwie prace zostały wysłane do recenzji w *Spectrochimica Acta A Mol Biomol Spectrosc i Molecules*.

Pani Anna Wójtowicz zgromadziła obszerny materiał badawczy, co wymagało dużego nakładu pracy i specjalistycznej wiedzy zarówno z chemii analitycznej jak również z biologii i medycyny sądowej. Należy zwrócić uwagę, że doktorantka w celu realizacji założonych celów pracy sięgnęła po szereg technik analitycznych takich jak fluorescencja, spektroskopia ramanowska ze wzbudzeniem promieniowaniem laserowym w zakresie UV, spektroskopia w podczerwieni ATR-FTIR, oraz obrazowanie FTIR w trybie transmisyjnym do detekcji zmian pośmiertnych tkanek zwierzęcych z chemometryczną oceną wyników.

Po lekturze rozprawy doktorskiej stwierdzam, że Pani mgr Anna Wojtowicz w pełni zrealizowała postawione cele badań naukowych nakreślone na etapie planowania pracy doktorskiej. Doktorantka potrafiła zdefiniować cele badań naukowych, rozwiązać je w oryginalny sposób stosując najnowsze techniki analityczne i ocenić uzyskane rezultaty badań.

W dysertacji, która została zredagowana bardzo starannie znalazło się kilka nieścisłości i błędów edytorskich, które poniżej przytaczam:

- Str. 30 ... w zdaniu ...”w składzie białek na widmach masowych...” , powinno być ...”widmach mas...”;
- Str. 40 W rozdziale 5.2 doktorantka opisuje zalety spektroskopii Ramana w analizie próbek biologicznych i stwierdza, że „...Spektroskopia Ramana opiera się na zjawisku nieelastycznego rozpraszania światła monochromatycznego, w wyniku którego dochodzi do zmiany długości fali promieniowania a obserwowana różnica dostarcza informacji o poziomach oscylacyjnych cząsteczki.” – Poprawniej byłoby napisać, że obserwowana różnica dostarcza informacji o odległościach pomiędzy poziomami oscylacyjnymi lub o energii drgań oscylacyjnych;
- Str. 87 w rozdziale 11.3.2 dotyczącym obrazowania FTIR autorka podaje że „ Każdorazowo przed rozpoczęciem pomiaru dla danego obszaru próbki zbierano widma tła z wolnej od tkanki części szkiełka CaF₂” - Poprawniej byłoby napisać, że z kryształu CaF₂ ;
- Str. 107 autorka opisuje pasma związane z drganiami.... grupy hemowej hemoglobiny, i amidu III szkieletu polipeptydowego..” poprawniej byłoby napisać „oraz pasma amidowe III (ν_{C-N});
- Na stronie 125 autorka podaje ...pasma przy 1591 cm⁻¹ odpowiada asymetrycznym drganiom C=O aminokwasów... - jest to raczej pasmo pochodzące od złożonych drgań zginających NH i rozciągających C-N;
- Na stronie 132 autorka stosuje określenie „...wzrost intensywności degradacji..” z pewnością byłoby napisać że: „Otrzymany wykres wskazuje na wyraźną degradację białka wraz z temperaturą”;



UNIwersytet w Białymstoku

Wydział Chemii



15-245 Białystok, ul. Ciołkowskiego 1K, ☎ (+48-85) 738-8034; e-mail: alina@uwb.edu.pl

- Str. 192 zdanie: „Widma zarejestrowane przy użyciu obu laserów z zakresu UV różniły się przede wszystkim...” należałoby sformułować precyzyjnie np. ”Widma otrzymane przy użyciu linii wzbudzających z zakresu UV...”;

Przytoczone uwagi edytorskie nie mają jednak istotnego charakteru i w mojej ocenie dysertacja jest napisana logicznie, bardzo starannie a szata graficzna jest estetyczna. Uważam, że założone cele pracy zostały zrealizowane a rozprawa doktorska zawiera bardzo wartościowy materiał badawczy. Mgr Anna Wójtowicz wykazała się innowacyjnym podejściem do analizy spektroskopowej materiału biologicznego, technik rozdzielawych oraz bardzo dobrą znajomością metod statystycznych. Ponadto doktorantka opracowała procedury analityczne tak, aby były one zgodne z nowoczesnymi zasadami białej chemii. Doktorantka może pochwalić się bardzo dobrym dorobkiem naukowym (sumaryczny IF 47,87), co potwierdza jej duże zaangażowanie na polu nauki.

Biorąc pod uwagę powyższe fakty stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa spełnia kryteria zwyczajowe i kryteria określone w Ustawie o Szkolnictwie Wyższym i Nauce z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018r. poz. 1668 z późn. zm.) i wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Chemicznych Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Anny Wójtowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Alina Duda



dr hab. Alina T. Dubis, prof. UwB
Uniwersytet w Białymstoku
Wydział Chemii

Białystok, 2023-07-03

**Wniosek o wyróżnienie
rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Wójtowicz, zatytułowanej
„Nowoczesne technik analizy materiału biologicznego w zastosowaniach toksykologiczno-
sądowych”**

Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską mgr Anny Wójtowicz wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Chemicznej Uniwersytetu Jagiellońskiego o wyróżnienie rozprawy.

Przedstawiona do oceny praca doktorska odznacza się wysoką jakością merytoryczną, zawiera elementy nowości naukowej i wnosi istotny wkład w rozwój dyscypliny nauki chemicznej w obszarze badań nad analizą materiału biologicznego w zastosowaniach toksykologiczno-sądowych.

Dorobek naukowy doktorantki jest wyróżniający. Jest ona autorką 5 publikacji związanych z rozprawą doktorską o łącznym IF 29,28. Pani Anna Wójtowicz jest w czterech publikacjach pierwszym autorem. Całkowity dorobek publikacyjny autorki stanowi 10 publikacji o IF wynoszącym 47,87. Doktorantka jest laureatką licznych nagród i stypendiów w tym rocznego Stypendium w Programie im. Iwanowskiej Narodowej Agencji Wymiany Akademickiej.

W mojej ocenie wkład uzyskanych przez doktorantkę wyników w rozwój badań nad zmianami biochemicznymi materiału biologicznego w tym monitorowania stopnia degradacji próbek biologicznych przechowywanych przed analizą, opracowanie modelu datowania wczesnych zmian biochemicznych płam krwi menstruacyjnej przy pomocy spektroskopii fluorescencyjnej oraz zmian późniejszych przy pomocy spektroskopii Ramana ze wzbudzeniem w zakresie UV, jest znaczący.

Alina Dubis

