



Instytut Chemii Organicznej
Polskiej Akademii Nauk

Prof. dr hab. Witold Danikiewicz
Kierownik Zespołu 1
+48 22 343 22 15
+48 607 350 610
witold.danikiewicz@icho.edu.pl

Warszawa 15 października 2021 r.

RECENZJA

pracy doktorskiej magistra Rafała Roli pt. „Zastosowanie chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas w badaniu metabolitów witaminy D”

Recenzowana praca doktorska została zrealizowana w ramach programu „Doktorat wdrożeniowy” w Laboratorium Diagnostycznym Masdiag Sp. z o.o. w Warszawie. Promotorem pracy jest dr hab. Sylwia Studzińska, prof. UMK z Katedry Chemii Środowiska i Bioanalitiky Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, a promotorem pomocniczym dr Tomasz Bieńkowski, Prezes Zarządu Spółki Masdiag.

Przedmiotem recenzowanej pracy było opracowanie dokładnych i możliwie łatwych do wykonania metod oznaczania metabolitów witaminy D (dla zwięzłości tą wspólną nazwą będę określał witaminy D₂ i D₃) we krwi, a także w mleku matek karmiących. Nie ulega wątpliwości, że ze względu na bardzo ważną rolę, jaką pełni witamina D w procesach życiowych człowieka możliwość szybkiej oceny jej stężenia (a ściślej – jej czynnych biologicznie metabolitów) w płynach ustrojowych jest niezwykle istotne w diagnostyce medycznej. Stosowane najczęściej metody immunoenzymatyczne charakteryzują się niezbyt wysoką dokładnością, a ponadto nie umożliwiają określenia stężenia konkretnych metabolitów. Najlepsze wyniki uzyskuje się stosując technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (HPLC-MS), ale opisane do tej pory metody były pracochłonne i kosztowne. Dlatego też podjęte przez Laboratorium Diagnostyczne Masdiag badania mające na celu opracowanie stosunkowo prostej, szybkiej, dokładnej i niezbyt drogiej metody oznaczania możliwie licznych metabolitów witaminy D były jak najbardziej uzasadnione. Tego zadania podjął się mgr Rafał Rola, a opiekunem jego pracy w Laboratorium Masdiag był dr Tomasz Bieńkowski, wybitny specjalista w dziedzinie spektrometrii mas i autor wielu publikacji naukowych z tej dziedziny. Współpraca z dr hab. Sylwią Studzińską, prof. UMK z Katedry Chemii Środowiska i Bioanalitiky Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, uznaną specjalistką w dziedzinie HPLC-MS, która podjęła się opieki promotorskiej, zaowocowała powstaniem pracy doktorskiej, którą mam przyjemność recenzować.

Podstawą pracy doktorskiej mgra Roli są cztery publikacje w uznanych czasopismach naukowych z dziedziny chemii analitycznej. Trzy z nich mają współczynnik wpływu IF równy 4 lub powyżej, a jedno ok. 2, co świadczy o ich dużym znaczeniu. Opublikowanie wyników pracy w tak dobrych czasopismach znacznie ułatwia mi opracowanie tej recenzji, ponieważ



wartość merytoryczna i poprawność wyników badań Doktoranta zostały już starannie ocenione przez recenzentów tych publikacji. W skład rozprawy wchodzi także dwa opracowania wewnętrzne firmy Masdiag opisujące Standardowe Procedury Operacyjne dotyczące oznaczania metabolitów witaminy D w suchej kropli krwi i w surowicy. Ostatnim elementem jest opis zestawu do badania stężenia metabolitów witaminy D w suchej kropli krwi, którego powstanie było możliwe m. in. dzięki badaniom mgra Roli.

W sytuacji, gdy podstawą pracy doktorskiej są publikacje wieloautorskie bardzo ważne jest ustalenie rzeczywistego wkładu Doktoranta w ich powstanie. W przypadku recenzowanej pracy nie ma wątpliwości, że wkład mgra Roli był dominujący. Świadczą o tym zarówno oświadczenia współautorów, jak i oświadczenie Doktoranta zamieszczone w rozprawie. Warto też podkreślić, że we wszystkich publikacjach mgr Rola jest autorem korespondencyjnym.

Sam układ rozprawy doktorskiej nie jest typowy dla prac tego rodzaju. Przede wszystkim brakuje wyraźnego rozgraniczenia wstępu teoretycznego, czyli przeglądu literatury obrazującej stan wiedzy w dziedzinie będącej przedmiotem pracy oraz wyników własnych. Pozytywnie oceniam natomiast fakt, że Doktorant nie zdecydował się na omawianie zawartości poszczególnych publikacji, a swoje wyniki przedstawił w logicznej kolejności, biorąc pod uwagę rodzaje badanych próbek i kolejne etapy analiz.

Rozprawę rozpoczyna rozdział, w którym Doktorant przedstawia cele i założenia swojej pracy. Nie ma potrzeby ich przepisywania w tym miejscu, trzeba jedynie powiedzieć, że celem finalnym było opracowanie i wdrożenie w laboratorium Masdiag procedur do rutynowego oznaczania stężenia metabolitów witaminy D w materiale biologicznym i – jak wynika z lektury rozprawy – cel ten został osiągnięty. W rozdziale drugim, podzielonym na liczne podrozdziały, jest zawarty zarówno przegląd literatury, jak i opis wyników własnych. Charakter przeglądowy mają podrozdziały 2.1 i 2.2, w których mgr Rola opisuje metabolizm witaminy D oraz znane metody oznaczania jej metabolitów w materiale biologicznym. Opis wyników uzyskanych podczas wykonywania pracy doktorskiej mgr Rola rozpoczyna w podrozdziale 2.3, zatytułowanym niemal tak samo jak cała rozprawa: „Zastosowanie chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas w analizie metabolitów witaminy D”.

Swoją pracę Doktorant rozpoczął od zbadania ścieżek fragmentacji jonów $[M + H]^+$ wzorców metabolitów witaminy D, a także ich pochodnych otrzymanych w wyniku reakcji cykloaddycji z 4-(4'-dimetyloaminofenilo)-1,2,4-triazolino-3,5-dionem (DAPTAD). Pochodne tego typu są stosowane w chemii analitycznej w celu zwiększenia wydajności jonizacji ESI mało polarnych związków, będących sprzężonymi dienami. Mgr Rola wykazał, że takie pochodne nie tylko zwiększają czułość detekcji, ale też bardzo upraszczają fragmentację. Uzyskane w tym etapie badań wyniki pozwoliły na wybranie odpowiednich par jon macierzysty – jon potomny w celu opracowania czulej i specyficznej metody oznaczania metabolitów z wykorzystaniem śledzenia wybranych ścieżek fragmentacji (MRM – *Multiple Reaction Monitoring*).

Drugi etap badań polegał na dobraniu optymalnych warunków rozdziału chromatograficznego metabolitów witaminy D. Doktorant badał zarówno wpływ rodzaju fazy



stacjonarnej, jak i eluenta na skuteczność rozdziału metabolitów, a także ich pochodnych otrzymywanych w reakcji z DAPTAD. W rezultacie zbadania wielu różnych faz stacjonarnych oraz eluentów mgr Rola wybrał „klasyczną” fazę stacjonarną C18 o rozmiarze ziarna 1,7 μm , a do elucji w trybie gradientowym zastosował fazę ruchomą złożoną z acetonitrylu z dodatkiem 0,1% kwasu mrówkowego i wody, również z dodatkiem 0,1% kwasu mrówkowego. W tych warunkach do rozdziału wybranych, derywatyzowanych metabolitów witaminy D wystarczyły 4 minuty, co oznacza możliwość wykonania dużej liczby analiz w krótkim czasie. Ten fragment rozprawy stwarza pewne trudności czytelnikowi, ponieważ Doktorant używa terminu „metabolity” zarówno dla określenia związków natywnych, jak i ich pochodnych, ale zdaję sobie sprawę, że dodawania za każdym razem słowa „pochodnych” w tekście wyglądałoby źle. Nie mniej jednak przynajmniej w podpisie do np. rys. 7 słowo „pochodnych” powinno się znaleźć.

Kolejny, bardzo obszerny podrozdział 2.4 dotyczy metod przygotowywania próbek materiału biologicznego do oznaczania metabolitów witaminy D. W jego kolejnych częściach Doktorant omawia szczegółowo sposób postępowania z suchymi kroplami krwi, surowicą krwi oraz mlekiem ludzkim. Wykonane badania pozwoliły na opracowanie metod charakteryzujących się wysokim stopniem odzysku badanych związków oraz dobrą powtarzalnością uzyskiwanych wyników.

Bardzo ważne wyniki z punktu widzenia zastosowania opracowanych metod analitycznych w diagnostyce medycznej są zawarte w podrozdziale 2.5. Przede wszystkim mgr Rola potwierdził, że wyniki uzyskiwane dla surowicy oraz suchej kropli krwi są ze sobą ściśle skorelowane, co potwierdza, że te oba materiały mogą być wykorzystywane zamiennie. W dalszej części tego rozdziału zostały opisane zastosowania opracowanych przez Doktoranta metod do oznaczania metabolitów witaminy D we krwi pępowinowej i obwodowej, a także w suchych kroplach krwi noworodków oraz mleku matek karmiących. Ostatnia część tego rozdziału dotyczyła badań populacyjnych, mających na celu określenie zakresów referencyjnych stężenia metabolitów witaminy D i zależności pomiędzy ich stężeniami.

Na zakończenie opisu wyników własnych mgr Rola zwięźle przedstawił swój wkład we wdrożenie opracowanych metod do rutynowej analizy metabolitów witaminy D w laboratorium Masdiag. Jako że doktorat mgra Roli ma charakter wdrożeniowy, ta część rozprawy jest bardzo istotna, ponieważ pokazuje, że wyniki jego badań rzeczywiście znalazły zastosowanie praktyczne i laboratorium Masdiag oferuje obecnie komercyjne analizy metabolitów witaminy D.

Rozdział 2 zamyka zestawienie cytowanej literatury liczące 82 pozycje. Podsumowując tę część rozprawy mgra Roli stwierdzam, że wyczerpująco, a równocześnie zwięźle przedstawił on swoje najważniejsze osiągnięcia, czyli opracowanie metod oznaczania metabolitów witaminy D u pacjentów i zastosowanie tych metod do rozwiązywania praktycznych problemów w dziedzinie diagnostyki medycznej.

Na pozostałą część pracy doktorskiej mgra Rafała Roli składają się kopie publikacji naukowych oraz opracowań wewnętrznych laboratorium Masdiag, stanowiące podstawę tej



pracy, podsumowanie wyników, streszczenia pracy w języku polskim i angielskim, wykaz dorobku naukowego Doktoranta oraz oświadczenia współautorów publikacji i opracowań.

Z edytorskiego punktu widzenia rozprawa doktorska mgra Rafała Roli jest przygotowana bardzo starannie. Na szczególne podkreślenie zasługuje bardzo poprawny język, którym praca jest napisana, a co w dzisiejszych czasach niestety nie jest częste, oraz staranna korekta – mimo wysiłków z mojej strony nie udało mi się znaleźć żadnych błędów. Jedyny zarzut dotyczy tego, że praca jest wydrukowana jednostronnie. - na pewno nie jest to podejście proekologiczne.

Podsumowując niniejszą recenzję pragnę podkreślić, że praca doktorska Pana mgr. Rafała Roli dotyczy bardzo ważnych i aktualnych zagadnień związanych z oznaczaniem ilościowym metabolitów witaminy D we krwi pacjentów, a także w mleku matek karmiących. Opublikowanie wyników w czterech cenionych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym i wysokim współczynniku wpływu IF świadczy o ich wysokiej wartości naukowej, a opracowanie i wdrożenie do produkcji pakietu, dzięki któremu pacjent może sam pobrać próbkę krwi i wysłać ją do analizy do laboratorium diagnostycznego – także o wysokiej wartości praktycznej pracy mgra Roli. Oświadczenia współautorów publikacji, a także samego Doktoranta oraz fakt, że we wszystkich pracach jest on autorem korespondencyjnym wyraźnie wskazują na jego wiodący udział w ich powstaniu. Uważam, że recenzowana praca jest wręcz modelowym przykładem właściwie zrealizowanego doktoratu wdrożeniowego.

Nie mam żadnych wątpliwości, że recenzowana rozprawa spełnia wymagania określone ustawą o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (z późniejszymi zmianami), w związku z czym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Chemicznych Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr. Rafała Roli do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę bardzo wysoki poziom merytoryczny pracy doktorskiej mgr. Rafała Roli oraz jej walory praktyczne **składam formalny wniosek o jej wyróżnienie**. Mgr Rola opublikował wyniki swoich badań wykonanych w ramach pracy doktorskiej w czterech artykułach naukowych zamieszczonych w bardzo dobrych czasopismach międzynarodowych o wysokim współczynniku wpływu i w każdej z tych prac był autorem korespondencyjnym. Ponadto jest on współautorem 11 innych publikacji w czasopismach z listy JCR i 3 spoza tej listy, a swoje wyniki prezentował na kilku konferencjach naukowych. Wyniki jego badań znalazły zastosowanie praktyczne, stając się podstawą oferty diagnostycznej laboratorium Masdiag dotyczącej oznaczania metabolitów witaminy D. Na podkreślenie zasługuje też fakt bardzo starannego przygotowania rozprawy doktorskiej, zarówno pod względem językowym, jak i edytorskim. Dlatego też oceniam rozprawę doktorską mgra Rafała Roli jako wyróżniającą się.