



KM.514.1.2023

Kraków, dnia 14 lipca 2023 roku

Dr hab. Jolanta Wąs-Gubała, prof. IES
Instytut Ekspertyz Sądowych im. Prof. dra Jana Sehna
w Krakowie

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Wójtowicz
zatytułowanej:
Nowoczesne techniki analizy materiału biologicznego
w zastosowaniach toksykologiczno-sądowych

Promotor pracy: dr hab. Renata Wietecha-Postuszny, prof. UJ
Wydział Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Anny Wójtowicz została wykonana w Pracowni Chemii Sądowej, należącej do Zespołu Analiz Sądowych i Klinicznych, Zakładu Chemii Analitycznej, Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Dotyczy ona zagadnień związanych z badaniami określonego rodzaju materiału dowodowego jakim jest materiał biologiczny pochodzenia ludzkiego, mogący dostarczyć cennych informacji na temat zaistniałego zdarzenia przestępczego. Jednym z istotnych problemów, które pojawiają się w badaniach toksykologiczno-sądowych oraz w trakcie interpretacji wyników tychże badań są pewne ograniczenia związane ze skomplikowanym składem matryc biologicznych i dużą liczbą czynników wpływających na zmiany zachodzące w ich obrębie wraz z upływem czasu. W ramach realizacji rozprawy doktorskiej Pani mgr Anna Wójtowicz podjęła badania w celu lepszego poznania tych ograniczeń oraz opracowania rzetelnych i skutecznych metod pozyskiwania informacji z danych rejestrowanych podczas analizy określonych matryc biologicznych, testując w tym celu techniki spektroskopii fluorescencyjnej, spektroskopii ramanowskiej, spektroskopii w podczerwieni (FTIR, ATR-FTIR) i chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS). **Wybór zarówno problemu badawczego, jak i przedmiotu badań, przedstawionego w recenzowanej rozprawie doktorskiej, jest zatem trafny i aktualny z naukowego punktu widzenia, gdyż udzielenie prawidłowych odpowiedzi na pytania stawiane przez organy ścigania i Wymiar Sprawiedliwości wymaga nieustającego rozwoju badań w zakresie wyboru najlepszych matryc biologicznych oraz opracowania odpowiednich dla tych badań metod analitycznych.**

Recenzowana rozprawa doktorska liczy 224 strony (w końcowej części zawiera jeszcze 5 dodatkowych stron, na których Doktoranta zestawiała swój znaczący dorobek naukowy). Zasadnicza część pracy, poprzedzona między innymi *Streszczeniem* w języku polskim i angielskim oraz *Wykazem stosowanych skrótów* w ujęciu tabelarycznym, została podzielona na *Część Literaturową* (45 stron pracy), *Cel pracy* (2 strony pracy), *Część Doświadczalną* (128 stron pracy), *Podsumowanie* (3 strony pracy), *Wnioski* (5 stron pracy) i *Bibliografię* (213 źródeł zestawionych w kolejności ich cytowania w tekście pracy).

Przeglądu literatury Doktorantka dokonała cechując w pierwszej kolejności materiał biologiczny pochodzenia ludzkiego w zastosowaniach toksykologiczno-sądowych, tj. badane matryce biologiczne, pozyskiwanie próbek biologicznych do tego typu badań oraz ocenę stabilności składu matrycy i analitów w matrycy. Następnie scharakteryzowała techniki badawcze wykorzystywane na potrzeby tychże badań, metody badań śladów biologicznych, metody badań pośmiertnych i stabilności przechowywania próbek oraz metody wielowymiarowej analizy chemometrycznej.

Wnioski z przeglądu literatury pozwoliły sformułować szczegółowe cele pracy, którymi było opracowanie nowoczesnych metod analizy materiału biologicznego, niewymagających skomplikowanego procesu przygotowania próbek i umożliwiających badania ich zmienności i/lub stabilności. Równocześnie Doktorantka postanowiła opracować innowacyjne metody identyfikacji zmian, zachodzących w matrycach biologicznych wraz z upływem czasu, tj. w ich składzie biochemicznym i zawartości ksenobiotyków oraz zaproponować model obserwowanych procesów.

Część doświadczalną pracy Doktorantka rozpoczęła od scharakteryzowania przedmiotu badań i procedur przygotowywania próbek do badań, a następnie wykorzystanych metod i technik badawczych wraz ze sposobami analizy uzyskanych danych. W celu usystematyzowania, w *Tabeli 3* zestawiała metody i techniki badawcze oraz metody analizy danych, zastosowane dla trzech głównych celów badawczych.

Uzyskane wyniki i ich dyskusję przedstawiła w odniesieniu do tychże celów, a pierwszym z nich było datowanie plam krwi menstrualnej. Doktorantka zaproponowała tutaj wykorzystanie techniki spektroskopii fluorescencyjnej, potwierdzając doświadczalnie, iż umożliwia ona skuteczne monitorowanie zmian zawartości endogennych fluoroforów w krwi menstruacyjnej, następujące w wyniku jej ekspozycji na czynniki środowiska zewnętrznego. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę mogą mieć duży potencjał praktyczny, będąc próbą powiązania obserwowanych zmian intensywności pasm emisji trzech wskazanych fluoroforów z czasem powstania plam, szczególnie w pierwszych godzinach po ich naniesieniu. Doktorantka zaproponowała równocześnie mechanizm obserwowanych zmian i wskazała na celowość dalszych badań w tym zakresie. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż w 2021 roku wyniki tych badań zostały przyjęte do opublikowania w renomowanych

czasopismach naukowych, charakteryzujących się istotnym współczynnikiem oddziaływania, tj. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* i *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. Następnie, Doktorantka wykazała, że zastosowanie spektroskopii ramanowskiej do datowania plam krwi menstruacyjnej w czasie pierwszych dwóch tygodni po ich naniesieniu, z równoczesnym wykorzystaniem metod analizy chemometrycznej, może znaleźć praktyczne zastosowanie w badaniach sądowych. Równocześnie z wykazaniem zalet metody Doktorantka wskazała na jej obecne ograniczenia i potrzebę kontynuowania badań w przyszłości.

Drugim z przyjętych przez Doktorantkę celów badawczych była ocena stabilności przechowywania próbek biologicznych, tj. matrycy i ksenobiotyków w matrycy. Do monitorowania zmian podczas przechowywania dwóch matryc biologicznych – ciała szklistego oka i homogenatu wątroby, w trzech warunkach temperaturowych, Doktorantka wykorzystowała spektroskopię ATR-FTIR i analizę grupowania danych metodą PCA. Uzyskane wyniki wskazały między innymi, że zastosowane doświadczalnie warunki temperaturowe nie zapewniły pełnej stabilności przechowywania badanych matryc biologicznych, a w celu zapewnienia stałości składu tego rodzaju próbek należy stosować niższe temperatury przechowywania od zastosowanych. Natomiast, aby monitorować stabilność substancji psychotropowych obecnych w dwóch badanych matrycach i trzech testowanych warunkach przechowywania Doktorantka wykorzystowała metodę LC-MS z mikroekstrakcją do fazy stałej, wykazując między innymi, iż matryca ciała szklistego oka zapewnia większą stabilność stężeń badanych ksenobiotyków niż matryca homogenatu wątroby. W 2021 roku wyniki tej części badań zostały opublikowane w renomowanym czasopiśmie naukowym *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly*, a w 2022 w czasopiśmie *Analytical and Bioanalytical Chemistry*.

Trzecim celem badawczym było ustalanie okresu pośmiertnego na podstawie zmian biochemicznych w składzie płynów ustrojowych i tkanek narządów, pobranych pośmiertnie od królików w dwóch przedziałach czasowych i przechowywanych w dwóch warunkach temperaturowych. Wyniki tych badań mogą być pomocne w szacowaniu czasu zgonu ofiary zdarzenia. Doktorantka zaproponowała zastosowanie techniki ATR-FTIR do wstępnej identyfikacji zmian pośmiertnych, szczególnie w matrycy ciała szklistego oka oraz komplementarnego wykorzystania techniki obrazowania FTIR, w trybie transmisji, w celu pozyskania informacji o dystrybucji składników w pobranych pośmiertnie tkankach wątroby. Najlepsze wyniki korelacji zmian biochemicznych, zachodzących do 24 godzin od śmierci, Doktorantka uzyskała z wykorzystaniem techniki spektroskopii ramanowskiej z laserem z zakresu ultrafioletu, a na podstawie otrzymanych wyników opracowała model klasyfikacji trzech badanych okresów pośmiertnych.

Podsumowanie i wnioski wyciągnięte dla wszystkich celów badawczych Doktorantka zestawiała między innymi w *Tabeli 23*, która jest zwięzłym zakończeniem pracy.

Struktura rozprawy doktorskiej jest logiczna. Rozprawa została opracowana bardzo starannie, tj. zarówno tekst pracy jak i jej materiał ilustracyjny, obejmujący 37 rysunków i 23 tabele. Doktorantka zadbała o poprawność językową pracy, jej przejrzystość i czytelność.

Poniżej przedstawiam **kilka pytań**, które nie umniejszają wartości recenzowanej rozprawy doktorskiej, ale nasunęły się podczas zapoznawania się z jej treścią, prosząc równocześnie Doktorantkę o ustosunkowanie się do nich w trakcie obrony pracy doktorskiej:

1. W rozdziale 13 Doktorantka omawia badania stabilności przechowywania matrycy metodą ATR-FTIR, a w podrozdziale 13.1.1 opisuje eksperyment wstępny, dotyczący wyboru sposobu przygotowania próbek i metody pomiaru. Z kolei w podrozdziale 13.1.2 omawia analizę próbek przeniesionych bezpośrednio na kryształ ATR, zaznaczając, iż rejestrowała widma ATR-FTIR w zakresie *fingerprint* $900-1800\text{ cm}^{-1}$, w którym zgodnie z danymi literaturowymi znajduje się większość charakterystycznych pasm, pochodzących od podstawowych biomolekuł. Czym zatem kierowała się Doktorantka podejmując badania próbek ciała szklanego oka bezpośrednio na szkiełkach mikroskopowych i w jaki sposób pomiary te były realizowane?
2. W rozdziale 14, w podrozdziale 14.2.2 Doktorantka po raz pierwszy stosuje określenie: *stopień degradacji*, pisząc np. o *najmniejszym i największym spodziewanym stopniu degradacji* próbek. Proszę wyjaśnić, co Doktorantka rozumie pod tym pojęciem?

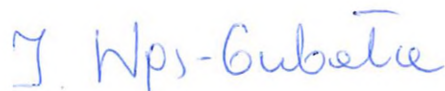
Podsumowując przeprowadzoną ocenę przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej stwierdzam, że jest to praca o bardzo wysokiej wartości merytorycznej. Badania zrealizowane w jej trakcie zostały wykonane w sposób rzetelny, a cele pracy zostały osiągnięte. Doktorantka dysponuje dużą wiedzą w zakresie objętym tematyką pracy, potrafi samodzielnie formułować problemy badawcze, planować i prowadzić badania oraz wyciągać właściwe wnioski.

Na szczególne podkreślenie zasługuje dyskusja uzyskanych wyników, przeprowadzona przez Doktorantkę w odniesieniu do każdego z celów badawczych i metod zastosowanych do ich realizacji, świadcząca o dogłębnej znajomości złożoności wnioskowania w badaniach sądowych. Tym samym doceniam ostrożne podejście Doktorantki do wyników uzyskanych w trakcie opracowywania rozprawy doktorskiej, w kontekście ich pospiesznego i bezkrytycznego wykorzystania w badaniach materiałów dowodowych.

Stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr Anny Wójtowicz spełnia warunki określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018, poz. 1668 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Chemicznej Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani mgr Anny Wójtowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie, biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy i jakość recenzowanej pracy, a także dotychczasowy dorobek publikacyjny Pani mgr Anny Wójtowicz, z **pełnym przekonaniem wnioskuję o wyróżnienie recenzowanej rozprawy doktorskiej.**

Recenzent



Dr hab. Jolanta Wąs-Gubała, prof. IES