



Gdańsk, 2017-09-05

## Recenzja

**rozprawy doktorskiej autorstwa mgr DOROTY WIRKUS a zatytułowanej**  
**„Opracowanie i zastosowanie metod oznaczania witamin oraz pierwiastków śladowych**  
**w ultrafiltratach pobranych od pacjentów poddawanych ciągłej terapii nerkozastępczej”**

Leczenie nerkozastępcze stosowane w ostrej niewydolności nerek związane jest ze zwiększonym ryzykiem utraty istotnych fizjologicznie substancji endogennych takich jak: aminokwasy, witaminy czy pierwiastki śladowe. Nie jest do końca pewne czy za utratę wyżej wymienionych związków stoi usuwanie tych związków z ultrafiltratem, sorpcja na błonach hemofiltratów czy może również niewystraczająca podaż witamin i mikroelementów w diecie pacjentów. Z tego też naukowego, ale i utylitarne, klinicznego, punktu widzenia bardzo interesującym stało się określenie czy i w jakiej ewentualnie ilości związki te są usuwane w wyniku zastosowanych ciągłych terapii nerkozastępczych.

Oceniana praca doktorska mgr Doroty Wirkus wykonana pod kierunkiem pp. Profesorów Piotra Stepnowskiego z Uniwersytetu Gdańskiego i Radosława Owczuka z Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego jest bardzo dobrym i cennym przykładem kompleksowego podejścia do badań złożonych procesów biologicznych.

Przedstawiona praca jest podsumowaniem badań Autorki nad jakościowym i ilościowym oznaczaniem dwunastu witamin rozpuszczalnych w wodzie oraz wybranych pierwiastków śladowych w ultrafiltratach pobranych od pacjentów poddawanych ciągłej terapii nerkozastępczej. Próbki do badań pobierane były od chorych na oddziale Kliniki Anestezjologii i Intensywnej Terapii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Wyniki badań Doktorantki zostały opublikowane w renomowanym czasopiśmie *Journal of Chromatography B* (5-letni Impact Factor 2,711). Uzyskane wyniki badań zawarte w pracy doktorskiej były także prezentowane na krajowych i międzynarodowych sympozjach specjalistycznych. Dysertacja potwierdza dobrą wiedzę i umiejętności kandydatki do stopnia naukowego doktora nauk chemicznych.

Rozprawa doktorska mgr Doroty Wirkus jest niezwykle obszerna, obejmuje bowiem praktycznie aż 180 stron. Część teoretyczna, zajmuje około 65 stron i zawiera bardzo szczegółowe informacje dotyczące badanej problematyki. Kompleksowo zostały opisane zagadnienia takie jak m.in.: właściwości fizykochemiczne oraz znaczenie biologiczne witamin rozpuszczalnych w wodzie oraz stosowane techniki przygotowania próbek i oznaczania witamin z użyciem HPLC i HPLC-MS. Skróceniwo opisano znaczenie biologiczne pierwiastków śladowych. Szczegółowo scharakteryzowane zostały także techniki leczenia nerkozastępczego.

Cel pracy został odpowiednio uzasadniony i jasno przedstawiony. Realizacja głównego celu została szczegółowo rozpisana na konkretne zadania badawcze obejmujące m.in: opracowanie i optymalizację metody jednoczesnego oznaczania witamin rozpuszczalnych w wodzie z zastosowaniem HPLC z detektorem UV-Vis oraz LC sprzężonej ze spektrometrią mas; sprawdzenie stopnia sorpcji witamin na hemofiltrach; wykorzystanie technik membranowych do wstępnego zateżenia próbek klinicznych; oczyszczanie próbek klinicznych z wykorzystaniem żywic jonowymiennych, a także oznaczanie jakościowe i ilościowe witamin i pierwiastków śladowych w próbkach pobranych od chorych poddawanych ciągłej terapii nerkozastępczej.

Część doświadczalna napisana jest bardzo dokładnie i z uwzględnieniem kolejnych aspektów pracy eksperymentalnej jak m.in.: optymalizacji metod oznaczania badanych związków, opracowanie metod izolacji i zateżania witamin z pobranych próbek, walidacja opracowanych metod analizy; sprawdzenie sorpcji witamin rozpuszczalnych w wodzie na hemofiltrach stosowanych w aparatach do ciągłej terapii nerkozastępczej czy wreszcie oznaczanie pierwiastków śladowych w ultrafiltratach z zastosowaniem absorpcyjnej spektrometrii atomowej. Omówienie wyników i ich dyskusja są napisane szczegółowo i bardzo rzetelnie. Udokumentowane zostały w 40 tabelach i na 35 rycinach. Na piśmiennictwo trafnie dobrane i umieszczone w pracy składa się uwaga aż 345 (!) pozycji literaturowych. Świadczy to niewątpliwie o tytanicznej wręcz pracy bibliograficznej i merytorycznej Autorki rozprawy.

Niewątpliwymi osiągnięciami Doktorantki opisanymi w rozprawie jest opracowanie odpowiednio czulej i selektywnej metodyki jakościowego i ilościowego oznaczania witamin z grupy rozpuszczalnych w wodzie (B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, B12) oraz wybranych pierwiastków śladowych (Zn, Cu, Cr, Cd, Pb, Ni). Wysoce interesującym są wnioski dotyczące braku przydatności techniki SPE do izolacji wybranych witamin z matrycy biologicznej jaką jest ultrafiltrat po ciągłej terapii nerkozastępczej. Tak samo zresztą wykazano brak możliwości zastosowania odwróconej osmozy jako metody izolacji witamin z zebranych próbek. Wykazano za to użyteczność żywic typu DEAE Sephadex jako sorbentu służącego do oczyszczania próbek ultrafiltratów w celu oznaczania witamin z grupy rozpuszczalnych w wodzie. Wreszcie najcenniejszym wnioskiem z przeprowadzonych badań, skądinąd wcześniej już postulowanym, jest wykazanie/potwierdzenie wpływu ciągłej terapii nerkozastępczej na zmniejszone poziomy niektórych witamin rozpuszczalnych w wodzie oraz pierwiastków śladowych w organizmach chorych poddawanych terapii.

Praca doktorska mgr Doroty Wirkus jest bardzo wartościowa badawczo i ma niewątpliwie walory praktyczne. Chcąc być jednak rzetelnym recenzentem, muszę zwrócić jeszcze uwagę na następujące aspekty pracy. Pierwsze pytanie jakie pojawia się po przeczytaniu

pracy to czym kierowano się przy wyborze zestawu witamin i pierwiastków śladowych, które następnie analizowano w ultrafiltratach? Czy przeprowadzono badania stabilności roztworów wodnych poszczególnych witamin a szczególnie witaminy C? Dobrze poznaną właściwością witaminy C jest jej mała stabilność strukturalna szczególnie pod wpływem czynników takich jak obecność tlenu, temperatura i promieniowanie UV o czym Autorka pisze zresztą na str. 99 pracy. Może właśnie ta cecha witaminy C stoi za trudnościami analitycznymi jej rozdzielania w układach porównywanych i analizowanych układach chromatograficznych. W Tabeli 15 brak jest wymienionej w tekście na str. 79 charakterystyki pacjentów poddanych leczeniu jak płeć, wiek i rodzaj zastosowanej terapii. Zalecałbym jednak stosowanie jednego typu jednostek miary stężenia a nie tak jak jest w pracy na str. 83 jednostką stężenia jest 'ppm' a np. w Tabeli 23 'µg/ml'. Na str. 84 optymalne warunki analizy chromatograficznej oraz pracy spektrometru mas przedstawione są w Tabeli 19 oraz także w Tabeli 25 o czym już nie ma informacji w tekście. Nie do końca jest jasne co Autorka ma na myśli przez określenie na str. 91 i 92, że próbkę uśredniono. Czy w przypadku pacjentów 6 i 10 także próbki „uśredniano”? Niezręcznym jest sformułowanie na str. 94 o metodzie oznaczeń końcowych 12 witamin. Czy faktycznie czas gradientu temperaturowego można określić jako „czas narostu”? Jakimi były przesłanki za podjęciem się w pierwszej kolejności opracowania metody HPLC-UV oznaczania witamin a nie od razy z zastosowaniem techniki LC-MS? W opisie optymalizacji metod chromatograficznych pomocne byłoby wymienienie takich parametrów jak współczynnik rozdzielania ( $R_s$ ), selektywność ( $\alpha$ ) czy wysokość półki teoretycznej ( $H$ ) jako parametrów badanych związków. Czy podjęto próbę oszacowania podaży analizowanych składników (witamin, pierwiastków śladowych) w diecie dializowanych pacjentów? Wreszcie ciekawym byłoby zaprojektowanie i uwzględnienie w badaniach także techniki dializy otrzewnowej i porównanie obu technik i ich wpływu na retencję witamin i pierwiastków śladowych.

Powyższe uwagi i pytania nie wpływają na wartość merytoryczną pracy, którą oceniam bardzo wysoko. Praca doktorska pani mgr Doroty Wirkus ma istotne walory oryginalności

naukowej. Przygotowanie Doktorantki w zakresie analizy chemicznej, jakościowej i ilościowej, jak również umiejętna analiza uzyskanych wyników i wyważona interpretacja biochemiczna budzi uznanie.

Biorąc powyższe pod uwagę oraz fakt spełnienia wymagań ustawowych wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Doroty Wirkus do publicznej obrony tez pracy przedstawionych w dysertacji.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Mahn', is centered on the page.