



UNIWERSYTET MARII CURIE SKŁODOWSKIEJ, WYDZIAŁ CHEMII

20-031 Lublin, PL MC Skłodowskiej 2

Prof. dr hab. Marek Majdan

e-mail: majdan.marek8@gmail.com lub marek.jerzy@poczta.umcs.lublin.pl

tel.: 48 81 537 57 29 lub 507 642 457

Lublin 10.11.2020

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. inż. Adriana Arendowskiego
zatytułowanej: „Nowe metody bezmatrycowe do laserowej spektrometrii
mas oraz ich zastosowanie w badaniu materiału biologicznego” .**

Analizy oparte na spektrometrii mas znajdują zainteresowanie badawcze w wielu szybko rozwijających się dyscyplinach. Choć obecne techniki MS odniosły wielki sukces, to jednak ciągle powstają nowe wyzwania w zastosowaniach praktycznych, zwłaszcza w detekcji biomolekuł w układach biologicznych. Zastosowanie nanomateriałów w analizach MS stwarza wielkie nadzieje ze względu na ich unikalne fizyczne i chemiczne właściwości, takie jak duża powierzchnia właściwa, łatwość modyfikacji powierzchni. Najnowsze wyzwania w spektrometrii mas to poszukiwanie i rozwój nowych bezmatrycowych laserowych metod desorpcji/ionizacji, w których nanomateriały są stosowane jako alternatywa w stosunku do tradycyjnych matryc organicznych w celu wyeliminowania interferencji w zakresie niskich mas oraz zminimalizowania efektu „sweet spot” związanego z nieregularnościami matrycy wynikającymi z agregacji lub izotropowej krystalizacji podczas preparatyki matrycy. Grafen jest szeroko stosowany w analizie MS ze względu na dużą powierzchnię właściwą, obecność zdelokalizowanych elektronów π w strukturze, termiczne przewodnictwo, trwałość i wysoką zdolność oddziaływań chemicznych. Materiały oparte na grafenie są stosowane jako matryce dla wielu organicznych cząsteczek w analizie z wykorzystaniem laserowej desorpcji-ionizacji MS.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr inż. Adriana Arendowskiego została wykonana pod kierunkiem Pana Prof. dr hab. inż. Tomasza Rumana z Wydziału Chemicznego Politechniki Rzeszowskiej.

Praca doktorska liczy 183 str. i zawiera następujące rozdziały: I- Streszczenie, II- Wykaz stosowanych skrótów, III- Cel i zakres pracy, IV- Część literaturowa, V- Część eksperymentalna, VI- Wyniki i dyskusja, VII- Podsumowanie, VIII- Bibliografia, IX- Dorobek naukowy.

W części literaturowej pracy opisano w sposób bardzo ciekawy techniki LDI MS, MALDI, SALDI, DIOS, NIMS, NALDI i technikę obrazowania spektrometrią mas. Przedstawiono również charakterystykę nanomateriałów wykorzystywanych w laserowej spektrometrii. **Wiadomo jest, że trudno jest określić mechanizm jonizacji cząsteczek organicznych, zwłaszcza w metodzie SALDI, ale szkoda że autor nie poświęcił temu zagadnieniu więcej miejsca w swojej rozprawie, przez co część literaturowa byłaby jeszcze bardziej atrakcyjna. Trzeba więc było przeanalizować i streścić następujące pozycje literaturowe:**

1. Franz Hillenkamp and Michael Karas, The MALDI Process and Method, <http://maldi.ch.pw.edu.pl/pomiary/Artykuly/The%20MALDI%20Process%20and%20Method.PDF>
2. Takashi ASANO, Tetsu YONEZAWA, Desorption and Ionization of Amino Acids by Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry (SALDI-MS) using Titanium Oxide Nanoparticles in Positive Ion Mode, https://www.jstage.jst.go.jp/article/nano/10/2/10_nano10_83/_article/-char/en
3. Kanako Sekimoto,^{†*} Motoshi Sakakura,^b Takatomo Kawamukai,^b Hiroshi Hike,^b Teruhisa Shiota,^b Fumihiko Usui,^b Yasuhiko Bando^b and Mitsuo Takayama^a, Ionization characteristics of amino acids in direct analysis in real time mass spectrometry, <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2014/an/c3an02193a#!div>,

a wtedy interpretacja wyników intensywności pików podczas analizy lizyny przedstawiona w niniejszej rozprawie byłaby łatwiejsza (patrz Rysunek 58, str. 116).

W części eksperymentalnej przedstawiono metody osadzania nanocząstek srebra, złota, węgla, dwutlenku tytanu na powierzchni stalowej płytki przy użyciu nebulizacji, elektroforezy i elektrolizy. Wykonano badania zawiesiny

nanocząstek srebra przeznaczonej do nebulizacji za pomocą spektrofotometrii i dynamicznego rozpraszania światła. Na uwagę zasługują piękne zdjęcia SEM nanocząstek srebra. To prawdziwy sukces, że przy powiększeniu 200 tys razy udało się uzyskać w miarę wyraźne zdjęcia agregatów srebra o średnicy kilkudziesięciu nanometrów.

Rysunki 17 i 19 przedstawiają zmiany intensywności adduktów tymidyny. Autor nie tłumaczy jednak, a przynajmniej nie próbuje wyjaśnić dlaczego addukt protonowy ma najmniejszą intensywność, a z kolei addukt sodowy ma wyższą intensywność od potasowego.

Rysunek 20 zawiera niejasności. Co oznacza określenie: rozkład wielkości cząstek po intensywności, liczbie, objętości? Czy tu chodzi o pochodną intensywności po wielkości?

Wyniki przedstawione w pracy doktorskiej pochodzą głównie z artykułów opublikowanych w renomowanych czasopismach, w których Doktorant jest autorem wiodącym .

W artykule opublikowanym w J. Mass Spectrometry 53 (2018) 369 autor opisuje zastosowanie targetu wzbogaconego o nanocząstki monoizotopowego srebra $^{109}\text{AgNPET}$ do wykrywania i oznaczania ilościowego aminokwasów: alaniny, argininy, kwasu asparaginowego, cysteiny, histydyny, metioniny, fenyloalaniny, seryny, tyrozyny. Autor podaje wartości wykrywalności (LOD) dla aminokwasów oraz ich dolną granicę wykrywalności LLQQ. Uzyskano bardzo dobre wyniki korelacji liniowej danych intensywności w funkcji stężenia. **Szkoda, że autor nie podał porównania z innymi metodami, takimi jak chociażby fluorescencja.** Już w 1987 r. Roach podał metodę oznaczania aminokwasów za pomocą metody chromatograficznej z detekcją fluorescencyjną na poziomie 20-500 amol (Mark C. Roach and Marlin D. Harmony, Anal. Chem. 1987, 59, 411-415), zaś w 1989 r. Wu otrzymał bardzo dobry wynik, bo 1.3×10^{-12} M w oznaczaniu argininy metoda kapilarnej elektroforezy z detekcją fluorescencyjną (SHAOLE WU and NORMAN J. DOVICH, Journal of Chromatography, 480 (1989) 141-155).

W artykule, który ukazał się w Analytical Methods 10 (45) 5398 autor omawia zastosowanie targetu wzbogaconego o nanocząstki złota (AuNPET) do wykrywania i oznaczania ilościowego aminokwasu lizyny. Bardzo ciekawe jest porównanie różnych metod (Tabela 13), które świadczy o wyższości metody MS nad innymi metodami. Zasadniczą kwestią jest chyba powtarzalność wyników.

Nie wiem, może źle zrozumiałem, ale nigdzie nie widzę błędów pomiaru stężeń lizyny.

Wyniki opublikowane w *Bioanalysis* 10(2018)83 dotyczą wykorzystania targetu wzbogaconego o cząstki srebra w poszukiwaniu biomarkerów nowotworu nerki w tkance ludzkiej. Rysunek 67 zawiera widma LDI MS dla obszaru imprintu zdrowej tkanki nerkowej i RCC. **Jak rozumiem poszczególne symbole literowe odpowiadają wartościom m/z, dla których stosunek intensywności był wyższy niż 2 lub niższy niż 0.5? Trzeba było chyba jednak podać te wartości.**

W pracy opublikowanej w *Analytical Biochemistry* 549 (2018) 45 porównano wyniki uzyskane metodą MALDI z metodą SALDI opartą na nanocząstkach złota w odniesieniu do profilowania metabolicznego dwóch szczepów pleśni-

Aspergillus versicolor i *Penicillium chrysogenum*. W obszarze niskiego m/z uzyskano znacznie więcej sygnałów niż w metodzie MALDI. **Rysunek 70 będący podsumowaniem analizy statystycznej jest bardzo ciekawy, bo udało się zauważyć 2 rozdzielone grupy wyników, jednak moim zdaniem byłoby dobrze powiększyć ten rysunek, bo jest nieczytelny.**

Obrazowanie łądygi cisu pospolitego (*Taxus baccata* L) opisano w artykule opublikowanym w *Phytochemical Analysis* 28(5) 448 (2017). Wykryto rozmieszczenie przestrzenne wybranych związków, takich jak m.in. taksany-alkaloidy terpenowe. W korze zauważono obecność asparagianu, taktyny M, bakatyny IV i taksyny B. Taxuspinę W znaleziono w tkance naczyniowej, kwas jabłkowy w tkance łykowej, zaś addukt chlorofilu w zewnętrznej warstwie gałązki. Ustalono korelację pomiędzy lokalizacją związków a morfologią rośliny.

Opis analizy moczu z użyciem nanocząstek złota AuNPET jest przyjęty do druku w *Analytical Sciences* (2020). Przeanalizowano mocz pięćdziesięciu osób ze zdiagnozowanym rakiem nerkowokomórkowym (RCC) i pięćdziesięciu zdrowych ochotników i na podstawie wyników sporządzono listę 15-tu potencjalnych biomarkerów nowotworowych, z których czternaście nie było wcześniej zdiagnozowanych. **Rysunek 76 podsumowujący analizę statystyczną jest nieczytelny, należało go powiększyć.**

Analiza surowicy krwi pięćdziesięciu pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem nerki w oparciu o metodę spektrometrii mas z laserową desorpcją z targetu pokrytego nanocząstkami złota została opisana w *J. Mass Spectrometry* 4561 6396(2020). Znaleziono wiele związków, które potencjalnie mogą być biomarkerami dla raka nerki. **Rysunek 78 przedstawiający analizę statystyczną**

danych z pomiarów MS surowicy metodą PSL-DA powinien być opatrzony szerszym komentarzem, bo nie jest jasne co oznaczają napisy komponent 1,2,3,4.

Na koniec jeszcze drobne uwagi redakcyjne .

W tekście znalazłem sformułowania: *wykonano widma zamiast zarejestrowano widma ; absorbcja zamiast absorpcja*

str. 105: *autorzy zmierzili 100 pmoli.....powinno: być autorzy stwierdzili obecność 100 pmoli*

str. 105: *jednak MALDI..... umożliwił wykrycie..... powinno: być jednak metoda MALDI umożliwiła wykrycie*

str. 113: *.. iż addukt.....jest prawie 1.6 raza wyższy powinno: być iż sygnał adduktu jest 1.6 raza silniejszy*

str. 113: *jak również potwierdzone przez znacznie słabszy obraz dla addukt sodu powinno być: jak również potwierdzono przez znacznie słabszy obraz dla adduktu sodu*

str. 148:.....*szereg metod , takich jak.....analizę* powinno być: *szereg metod , takich jak.... analiza*

str. 157: *Dziesięć metabolitów..... wykazują* powinno być: *Dziesięć metabolitów..... wykazuje*

Zamieszczone uwagi i wątpliwości, nie umniejszają wartości rozprawy, która zawiera obszerny materiał doświadczalny. Autora cechuje dokładność i umiejętność samodzielnego planowania , prowadzenia badań oraz pracy w zespole.

Autor legitymuje się całkiem pokaźnym jak na młodego pracownika naukowego dorobkiem naukowym w postaci 11 artykułów opublikowanych w renomowanych czasopismach, 2 artykułów popularnonaukowych, 3 posterów , 3 referatów na konferencjach krajowych; jest poza tym kierownikiem i wykonawcą grantu Nauki i Szkolnictwa Wyższego RP ; otrzymał stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego za wybitne osiągnięcia w nauce; otrzymał Nagrodę: "Primus Inter Pares" Fundacji na rzecz rozwoju Politechniki Rzeszowskiej oraz Nagrodę Rektora Politechniki Rzeszowskiej.

Reasumując oceniam bardzo pozytywnie pracę doktorską wraz z dorobkiem naukowym Pana mgr inż. Adriana Arendowskiego i stwierdzam, że spełnia ona

wymagania ustawowe (Ustawa o stopniach naukowych i tytule naukowym w zakresie sztuki z dn. 14 marca 2003 wraz z późniejszymi poprawkami podanymi w Ustawie „Prawo o szkolnictwie wyższym”) stawiane pracom doktorskim. W związku z tym proszę Radę Wydziału Chemicznego Politechniki Rzeszowskiej o dopuszczenie Pana mgr inż. Adriana Arendowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie zaś proszę o wyróżnienie przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej z uwagi na jej wyjątkowo innowacyjny charakter i aspekt praktyczny.

Marek Majdan

Marek Majdan

Marek Majdan