



dr hab. Paweł Piotr Pomastowski
Interdyscyplinarne Centrum Nowoczesnych Technologii
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Recenzja

pracy doktorskiej Pana mgr Adriana Arendowskiego pt. : „*Nowe metody bezmatrycowe do laserowej spektrometrii mas oraz ich zastosowanie w badaniu materiału biologicznego*” przedstawionej Radzie Dyscypliny Inżynierii Chemicznej Politechniki Rzeszowskiej w celu uzyskania stopnia doktora w dziedzinie nauk inżynieryjno-technicznych w dyscyplinie inżynieria chemiczna

Uwagi ogólne

Pan mgr Adrian Arendowski wykonał pracę doktorską pod opieką promotora Pana prof. dr hab. Tomasza Rumana w Zakładzie Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Rzeszowskiej im. Ignacego Łukasiewicza. Tematyka recenzowanej pracy leży w zakresie badań prowadzonych w zespole kierowanym Pana Profesora Tomasza Rumana i dotyczy syntezy nowych nanomateriałów oraz ich zastosowania w spektrometrii mas, w szczególności w technice laserowej desorpcji/ionizacji (LDI) próbki wspomaganą nanostrukturami. Praca doktorska Pana mgr Adriana Arendowskiego doskonale wpisuje się w nurt badań związanych z aktualnym problemem wykorzystywania nanocząstek metali, w szczególności srebra i złota, w analitycznym procesie identyfikacji i oznaczania biologicznie aktywnych związków, jak również bezpośrednio w różnych matrycach biologicznych.

Recenzowana dysertacja jest wynikiem prac badawczych opublikowanych w 10 czasopismach naukowych z listy JCR o zasięgu międzynarodowym charakteryzujących się dobrym współczynnikiem oddziaływania IF (sumaryczny IF = 26,5, PM = 700) m.in. *Analytica Chimica Acta* (IF = 5,256; PM = 100), *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (IF = 3,286; PM = 70) czy *Journal of Mass Spectrometry* (IF = 2,267; PM = 70). Aktualny wskaźnik Hirscha Doktoranta wynosi 4 (baza Web of Science, 01 grudzień 2020r.) ze wskazaniem liniowego wzrostu liczby cytowań w czasie. Warto podkreślić, iż w siedmiu z wymienionych prac Doktorant jest pierwszym Autorem. Pomimo tak dobrego dorobku publikacyjnego Pan mgr Adrian Arendowski zdecydował się na przygotowanie klasycznej rozprawy doktorskiej, co w moim odczuciu było zaskakujące. Jednakże, po lekturze

przedłożonej do oceny dysertacji, recenzent zyskał szansę na poznanie sposobu myślenia Doktoranta, wybranych dróg realizacji poszczególnych etapów pracy oraz podejścia do uzyskanych wyników i ich interpretacji, co w przypadku analiz przy wykorzystaniu technik laserowej jonizacji/desorpcji próbki nie jest łatwe. Ten aspekt pracy oceniam bardzo wysoko, gdyż dysertacja została przygotowana wzorcowo i stanowi dobry punkt wyjścia do dalszego rozwoju naukowego Doktoranta

W ramach przedstawianej pracy doktorskiej przeprowadzono kompleksowe badania obejmujące syntezę oraz charakterystykę nanocząstek srebra oraz złota stosowanych do laserowej jonizacji/desorpcji aminokwasów, metabolitów obecnych w tkance nerkowej, pleśni oraz łądydze cisu pospolitego.

Ocena formalna i merytoryczna pracy

Oceniana praca doktorska została przedstawiona w klasycznej formie zawierającej wszystkie niezbędne elementy rozprawy naukowej. Tytuł przedstawionej rozprawy jest poprawnie zdefiniowany i odpowiada stawianemu celowi oraz uzyskanym wynikom badań. Praca jest bardzo dobrze ustrukturyzowana w ramach określonego tematu pracy zagadnienia. Jest obszerna, obejmuje 183 stron tekstu i składa się ze streszczenia w wersji polskiej oraz angielskiej, wykazu stosowanych skrótów, celu pracy oraz kolejnych logicznie ułożonych rozdziałów: części literaturowej (przegląd literaturowy – 34 strony), części eksperymentalnej zawierającej opis stosowanych w pracy metod badawczych (13 stron) oraz dyskusję uzyskanych wyników w przeprowadzonych eksperymentach (95 stron), podsumowania i wniosków końcowych oraz bibliografię obejmującą 297 pozycji cytowania zróżnicowanych źródeł literaturowych dotyczących różnych aspektów omawianego tematu pracy, głównie artykułów naukowych i monografii. Dobór literatury wykorzystanej przy napisaniu pracy jest uzasadniony merytorycznie i świadczy o dobrym rozeznaniu Doktoranta w podejmowanej problematyce badawczej. Na podkreślenie zasługuje dominujący wkład objętościowy w pracy części eksperymentalnej, ponad 1/2 całości manuskryptu rozprawy. Na koniec pracy doktorskiej został dołączony dorobek naukowy Pana mgr Adriana Arendowskiego obejmujący: 11 artykułów naukowych oraz 2 popularnonaukowe, udział w 7 konferencjach o zasięgu krajowym, międzynarodowym, projekcie badawczym „Diamentowy grant” oraz uzyskane przez Doktoranta nagrody m.in. stypendium MNiSW za wybitne osiągnięcia w nauce.

Praca napisana jest poprawnym językiem naukowym w sposób przejrzysty, jednoznaczny i z zachowaniem spójności wypowiedzi. Trafnie ilustrowana wzorami, wykresami, schematami reakcji i tabelami, które pomagają czytelnikowi lepiej się zorientować w treści prezentowanych wypowiedzi w tekście.

W streszczeniu, znajdującym się na początku dysertacji (które w zasadzie jest wstępem), Doktorant w klarowny sposób określa aktualność podejmowanej w pracy tematyki badawczej, związanej z potrzebą poszukiwania nowych rozwiązań analitycznych stosowanych w spektrometrii mas, ze wskazaniem techniki laserowej desorpcji/ionizacji próbki oraz jej zastosowanie w szeroko pojętym obrazowaniu w chemii, biologii czy medycynie. Streszczenie daje integralne przedstawienie o zasadności podjętego problemu badawczego i strukturze wykonanej pracy. Doktorant, od tego miejsca pracy stosuje anglicyzmy np. „target wzbogacony nanocząstkami”, zamiast „płytką wzbogaconą nanocząstkami”. Anglicyzmy są oceniane przez purystów językowych jako negatywny efekt oddziaływania języka angielskiego na język polski. W ocenie recenzenta stosowana przez Doktoranta terminologia wynika z znajomości fachowej literatury (głównie anglojęzycznej) z zakresu LDI i stanowi semantyczne niedociągnięcie nieuwzględniające kwestiom merytorycznym dysertacji.

W kolejnej części pracy został sformułowany cel i główne zadania badawcze pracy doktorskiej. Moim zdaniem, ten rozdział powinien znajdować się bezpośrednio po przeglądzie literaturowym. Celem nadrzędnym rozprawy doktorskiej Pana mgr Adriana Arentowskiego było opracowanie metod bezmatrycowanych do analizy spektrometrycznej „wybranych obiektów biologicznych” przy wykorzystaniu techniki laserowej jonizacji/desorpcji próbki wspomaganą nanostrukturami. Główne zadania zostały podzielone na 8 konsekwentnych etapów badawczych. Pierwszy obejmował studium literaturowe (stąd najpewniej motywacja Doktoranta, na umieszczenie celu i zakresu pracy przed częścią literaturową), kolejne dotyczyły już części eksperymentalnej: zaproponowanie nowych metod pokrycia materiałów nanocząstkami do analiz LDI, badanie efektywności jonizacji uzyskanych nanostruktur, określenie granic (nie „limitów” – kolejny anglicyzm) wykrywalności oraz wskazanie zastosowania uzyskanych płytek do analiz mikrobiologicznych, obrazowania związków biologicznie aktywnych wchodzących w skład tkanki nowotworowej ze wskazaniem potencjalnych biomarkerów patogenezy nowotworu. Cel pracy jest uzasadniony i ma bezpośrednie odzwierciedlenie w uzyskanych wynikach badań.

W części literaturowej Pan mgr Adrian Arendowski przedstawia w spójny sposób zagadnienia określonego tematu. W pierwszym rozdziale Doktorant omawia podstawowe kwestie związane ze spektrometrią mas, stosowane metody jonizacji oraz analizatory, z nakierowaniem na różne warianty techniki LDI. Charakteryzuje spektrometryczną technikę laserowej jonizacji/desorpcji próbki wspomaganą matrycą (MALDI), opisując najczęściej stosowane matryce organiczne w analizie biologicznie aktywnych związków takich jak m.in. białka, peptydy, kwasy nukleinowe, metody nanoszenia próbek, wskazując tym samym problem badawczy wynikający ze stosowania matryc organicznych. W kolejnych rozdziałach części teoretycznej Doktorant przedstawia warianty bez-matrycowe techniki LDI: wspomaganą powierzchnią (SALDI), krzemem (DIOS) i jego modyfikacje ciekłymi inicjatorami (NIMS) oraz nanostrukturami (NALDI). Szczególna uwaga została zwrócona również na problem obrazowania przy wykorzystaniu spektrometrii mas. W tym miejscu pojawia się pytanie: dlaczego doktorant nie porównał ze sobą podstawowych zalet i ograniczeń stosowanych w wariantach techniki LDI, zwłaszcza w kontekście mechanizmów jonizacji w trybie dodatnim a w szczególności ujemnym? W kolejnej części pracy Doktorant przedstawił stosowane nanostruktury w metodach laserowych: węgiel, krzem oraz nanocząstki metali: złota (AuNPs), srebra (AgNPs), platyny (PtNPs) oraz tlenki metali i pochodne. Na komentarz zasługuje, wskazanie przez Doktoranta pracy Gedda i Wu, w której to autorzy do identyfikacji *Escherichii coli* na poziomie 10^2 CFU/ μ l wykorzystali modyfikowany tlenek cynku. Dlaczego Doktorant nie wspomina o wpływie efektów plazmonicznych nanocząstek metali i ich tlenków na przebieg procesów jonizacji/desorpcji analitu? Pytanie to nie zmienia faktu, że przedstawiony do recenzji przegląd literaturowy jest bardzo dobrym wprowadzeniem do podejmowanej w pracy tematyki badawczej tworząc szerokie kompetentne informacyjne tło dla badań eksperymentalnych i świadczy o dokonanej przez Doktoranta rzetelnej analizie doniesień literaturowych.

Część eksperymentalna pracy składa się z dwóch podstawowych rozdziałów zatytułowanych jako „Część eksperymentalna” i „Wyniki i dyskusja”. W rozdziale „Część eksperymentalna” zostały przedstawione materiały, aparatura, oprogramowanie i metody stosowane podczas realizacji prac badawczych. W kolejnych częściach pracy doktorskiej zostały przedstawione metody syntezy i charakterystyki fizykochemicznej uzyskanych nanostruktur. Interesującym zagadnieniem jest pomiar potencjału zeta przy wykorzystaniu „elektroforetycznego rozpraszania światła”. W związku z tym, jaka jest fenomenologia mierzonego potencjału zeta nanocząstek zawieszonych w roztworach organicznych? Na uwagę zasługuje również tytuł rozdziału 5.2.5. „Elektroforeza nanocząstek”. Jak słusznie

zostało wskazane w dalszych częściach pracy doktorskiej, elektroforeza należy do zjawisk elektrokinetycznych, jednakże procesy utlenienia-redukcji jonów srebra są następstwem powierzchniowych procesów, zachodzących na granicy faz, takich jak sorpcja i krystalizacja krystalitów, np. srebra metalicznego w postaci nanocząstek. Jaka była motywacja Doktoranta do nazwania tak tego rozdziału? W części pracy „Wyniki i dyskusja” zostały przedstawione nowe metody wytwarzania nanostruktur przy wykorzystaniu nebulizacji. Doktorant przedstawił zestawienie zdjęć zawiesin nanocząstek monoizotopowego srebra w różnych wariantach. Doktorant, postuluje, że najlepszymi układami do syntezy AgNPs był układ 6 w tetrahydrofuranie oraz układ 3 w mieszaninie 1:1 izopronanol-acetonitryl, ze względu na wysoką zdolność jonizacji tymidyny. Dlaczego tymidyny? Z czego może wynikać ta wysoka zdolność jonizacji? Interesujące jest w tym kontekście zarejestrowane widmo plazmonowe AgNPs zamieszczone na rysunku 20.D. oraz obserwacja klastrów i adduktów srebra z matrycą. Dlaczego nie przedstawiono pełnego zakresu widma np. od 200nm? Jaka jest wydajność redukcji? Następnie, Doktorant przedstawia wyniki uzyskane dzięki zastosowaniu „Elektroforezy nanocząstek”, wprowadzając czytelnika w aktualne rozwiązania metodologiczne w tym zakresie. Potem są przedstawione wyniki m.in. zdjęcia pokazujące stosowane elektrody i widma LDI MS uzyskanych płytek. Nie można się, zgodzić ze stwierdzeniem, że uzyskana wartość potencjału zeta +14 mV przy pH 3 jest dowodem przemieszczania się nanocząstek. Taka wartość świadczy, o stosunkowo niskiej stabilności dyspersji uzyskanej zawiesiny nanocząstek. Pytanie stanowi, co jest źródłem dodatniego ładunku? Wtórnie utlenione jony srebra czy powierzchniowo związane niezredukowane jony na powierzchni nanocząstek? W kolejnej części pracy doktorskiej zostały przedstawione wyniki elektrochemicznego osadzania nanocząstek złota, nanodiamentów oraz tlenku tytanu(IV). Szczególnie interesujące są obserwacje wynikające z agregacji nanodiamentów. Następnie, Doktorant przedstawił dla wybranych układów płytek wyniki analizy spektrometrycznej dla kolejnych związków testowych oraz wyniki obrazowania powierzchni płytek przy wykorzystaniu SEM-EDX. Kolejne części rozdziału dotyczyły syntezy nanostruktur na powierzchni płytki ze stali nierdzewnej przy wykorzystaniu elektrolizy oraz analogicznego pakietu technik instrumentalnych wykorzystanych do ich fizykochemicznej charakterystyki ze wskazaniem przez Pana mgr Adriana Arendowskiego potencjału uzyskanych wyników i wskazania potrzeby rozwijania w przyszłości tych metod. Kolejna część pracy doktorskiej dotyczy praktycznego zastosowania rozwijanej przez Doktoranta techniki LDI MS do szeroko pojętego obrazowania. Jednakże, kolejne rozdziały dotyczyły badań ilościowych aminokwasów na płytkach pokrytych nanostrukturami srebra

monoizotopowego oraz złota. Doktorant przedstawił wyniki dla 11 aminokwasów wyznaczając podstawowe parametry walidacyjne opracowanej metody. Granice oznaczalności aminokwasów osiągnięto na poziomie ng/ml. Uzyskane wyniki świadczą o wysokim potencjale aplikacyjnym otrzymanych płytek. Następne rozdziały dotyczyły zastosowania w/w płytek do obrazowania tkanki nerkowej oraz próby identyfikacji wybranych metabolitów. W jaki sposób dokonano identyfikacji związków zestawionych w tabeli nr 15? W kolejnym korku Doktorant dokonał analizy statystycznej przy wykorzystaniu m.in. PCA oraz podjęto próbę wskazania potencjalnych biomarkerów raka nerki. Kontynuacja badań z tego zakresu przy statystycznie istotnej populacji próbek tkanek nowotworowych może stanowić ciekawą alternatywę kliniczną. Dalsza część pracy dotyczyła zastosowania otrzymanych płytek do profilowania metabolicznego dwóch gatunków pleśni, równoległe z przeprowadzeniem kontrolnych analiz MALDI przy wykorzystaniu matryc HCCA i DHB. Zidentyfikowano szereg metabolitów niskocząsteczkowych i zestawiono je w tabeli nr 17. W jaki sposób dokonano ich identyfikacji w repozytorium IDEOM? Otrzymane przez Doktoranta rezultaty pozwoliły na rozróżnienie badanych grzybów, przy wykorzystaniu metody PLS-DA. Kolejne wyniki dotyczyły obrazowania tkanki roślinnej cisu pospolitego, dzięki któremu Pan mgr Adrian Arendowski zidentyfikował szereg związków niskocząsteczkowych w tym taksanów. Dzięki zastosowaniu płytek z nanocząstkami srebra i złota do obrazowania tkanki roślinnej było możliwe powiązanie występowania danego związku niskomasowego z morfologią badanego materiału. Kolejne dwa rozdziały dotyczyły analiz metabolomicznych moczu oraz surowicy pochodzących od chorych na raka nerki oraz 50 zdrowych ochotników. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej, dzięki, której Doktorant był w stanie rozdzielić całkowicie dwie badane grupy, co jest imponujące. Dysertacja kończy się zwięzłym podsumowaniem uzyskanych wyników.

Oceniając w całości część eksperymentalną podkreślam, że badania eksperymentalne zrealizowane przez Pana mgr Adriana Arendowskiego są oparte o klarownie określoną koncepcję, konsekwentny plan wykonania podstawowych zadań pracy oraz właściwie dobraną metodologię i metodyki badań. W rezultacie przeprowadzonych badań eksperymentalnych Doktorant uzyskał interesujące wyniki, które zawierają elementy nowości naukowej: szczególnie zaproponowane metody otrzymania nanostruktur metali do analizy ilościowej aminokwasów oraz szeroko-pojętego obrazowania. Wskazane w recenzji uwagi mają charakter całkowicie dyskusyjny i nie zmieniają bardzo pozytywnej oceny przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została przygotowana w sposób staranny od strony merytorycznej i edytorskiej. Zawiera pełną dokumentację przeprowadzonych badań, ciekawą i rzetelną dyskusję uzyskanych wyników oraz uzasadnione wnioski. Rozprawa doktorska w pełni spełnia kryteria stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 13 Ustawy z dnia 14.03.2003r. (Dz.U. 2003r. numer 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami) o tytułach i stopniach naukowych i wnioskuję o dopuszczenie Pana mgr Adriana Arendowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, z uwagi na ponadprzeciętny dorobek publikacyjny oraz wysoki potencjał aplikacyjny opracowanych metod LDI, wnioskuję do Rady Dyscypliny Inżynierii Chemicznej Politechniki Rzeszowskiej o wyróżnienie rozprawy doktorskiej autorstwa Pana mgr Adriana Arendowskiego.

Toruń, dnia 30 listopada 2020r.

Pomostowski

