



# POLITECHNIKA BIAŁOSTOCKA

Wydział Budownictwa i Nauk o Środowisku

**Katedra Chemii, Biologii i Biotechnologii**

ul. Wiejska 45A, 15-351 Białystok, tel. 667972217,

e-mail: m.kalinowska@pb.edu.pl

---

Białystok, 07.07.2023

dr hab. Monika Kalinowska, prof. PB  
Politechnika Białostocka  
Katedra Chemii, Biologii i Biotechnologii

## *Ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Artura Kołodzieja*

*pt. „Synteza i badania nanostruktur wspomagających laserową spektrometrię mas”*

*wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Tomasza Rumana*

Metoda laserowej desorpcji/ jonizacji wspomaganą matrycą (MALDI) jest jedną z najczęściej stosowanych technik łagodnej jonizacji stosowanych we współczesnej spektrometrii mas (MS) używaną do analizy związków biologicznie czynnych, w tym peptydów, białek, lipidów, polimerów, oligonukleotydów i innych produktów naturalnych. Pomimo tak dużego zastosowania technika MALDI-MS wykazuje jednak pewne ograniczenia. Jednym z nich jest niska czułość analizy małowcząsteczkowych analitów wynikająca z obecności licznych sygnałów o wysokiej intensywności pochodzących od matrycy, trudności z doбором matrycy niewspółkryształizującej z analitem czy też ryzyko niskiej wydajności jonizacji obojętnych analitów. Rozwój techniki MALDI-MS w celu zastosowania jej do kompleksowej analizy bardzo złożonych próbek biologicznych (typu tkanki, płyn ustrojowy) wymusza poszukiwanie nowych matryc lub ich całkowitego zastąpienia np. nanostrukturami. Biorąc pod uwagę powyższe, badania prowadzone przez mgr inż. Artura Kołodzieja w ramach jego rozprawy doktorskiej są ważne i kluczowe w rozwoju technik laserowej desorpcji /jonizacji sprzężonej ze spektrometrią mas (LOI-MS).

Na rozprawę doktorską Pana A. Kołodzieja składa się cykl dziewięciu prac opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych opublikowanych w latach 2020-

2023. Osiem z nich zostało opublikowanych w czasopismach o wysokim impact factor w zakresie 2,394-14,026 (punktacja ministerialna: 70-140); sumaryczny impact factor cyklu publikacji: 36,744 (sumaryczna punktacja ministerialna: 760 pkt). To znakomity dorobek naukowy. W pierwszej i drugiej publikacji wykorzystano nanocząstki złota i monoizotopowego srebra-109 do modyfikacji płytek stosowanych do analizy kwasów karboksylowych oraz mykotoksyn (również izolowanych z materiałów budowlanych) metodą spektrometrii masowej (MS) typu LDI-ToF-MS. Najniższe limity detekcji oraz najwyższą intensywność sygnałów uzyskano w przypadku zastosowania płytek wzbogaconych nanocząsteczkami Ag-109. Wnioskowano, że proponowana metoda może być alternatywą do MALDI-MS i chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas LC-MS/MS. Wkład Pana mgr inż. A. Kołodzieja w pierwszą publikację był na poziomie 33% i polegał na przeprowadzeniu analizy kwasów za pomocą spektrometru masowego oraz analizie i graficznym opracowaniu wyników badań. W drugiej zgodnie z kolejnością publikacji Pan A. Kołodziej przeprowadził analizy badanych związków i analizy wyników (strona 39 rozprawy doktorskiej) i zadeklarował 10-procentowy udział w publikacji. Proszę sprecyzować jakiego typu analizy wykonał Doktorant. Czy Doktorant uczestniczył w przygotowaniu płytek modyfikowanych nanocząsteczkami? Jakie metody zostały użyte do oceny rozmiaru i kształtu nanocząstek? W kolejnych pięciu publikacjach oznaczonych numerami 3-7 udział Doktoranta określony został na poziomie 25%, a dzięki dokładnemu opisowi zakresu prowadzonych badań można stwierdzić, że Doktorant zaangażowany był na wszystkich etapach eksperymentu (od syntezy nanocząstek i ich badania fizykochemiczne, po analizę za pomocą spektrometru masowego z laserową desorpcją/ionizacją). W publikacjach o numerach 3 i 4 zostały przedstawione etapy pracy doktorskiej, w ramach których Doktorant opracował nowe techniki syntezy nanocząstek monoizotopowego srebra Ag-109 za pomocą laserowej ablacji w rozpuszczalniku ( $^{109}\text{AgLGN}$ ) i wykonał obrazowanie otrzymanych nanocząstek za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM). Wielkość otrzymanych nanocząstek była w zakresie 20-40 nm. W publikacji opisano dodatkowo wyniki analiz UV/Vis oraz DLS (dynamiczne rozpraszanie światła), za pomocą których określono rozmiar i dyspersję nanocząstek. Wytworzone nanocząstki nanoszono na płytkę ze stali nierdzewnej. Tak przygotowane płytki zastosowano do analizy wzorcowych związków oraz do obrazowania odcisku palca. Wyniki badań wskazują, że zastosowanie  $^{109}\text{AgLGN}$  pozwala na zwiększenie intensywności sygnałów, zmniejszenie błędu oznaczenia w porównaniu do klasycznej metody MALDI oraz pozwala na identyfikację różnych grup związków, w tym nieorganicznych i organicznych w badanym odcisku palca. Nowa metoda syntezy nanocząstek o zastosowaniu w LDI-MS zasługuje na duże uznanie.

Pozwala na skrócenie czasu syntezy, zmniejszenie kosztów i poprawy czystości otrzymanych nanocząstek. Publikacje o nr 5-7 dotyczą określenia granic wykrywalności i oznaczalności (LOD, LOA) biologicznie ważnych związków, w tym kwasów karboksylowych, kwasów 3-hydroksykarboksylowych i aminokwasów oznaczonych metodą laserowej desorpcji/ionizacji sprzężonej ze spektrometrią mas z wykorzystaniem płytek (targetów) z naniesionymi nanocząsteczkami srebra-109 otrzymanych za pomocą laserowej ablacji w rozpuszczalniku. Dodatkowo przeprowadzono badania, w których określono wpływ matrycy próbki (próbka surowicy krwi). Uzyskano niższe zakresy o niższej LOD i LOQ w porównaniu do techniki stosowanej w oznaczaniu tych samych związków co w publikacji nr 1. W publikacja wykazano również możliwość oznaczenia związków w surowicy krwi metodą obrazowania przy pomocy spektrometrii mas (MSI). Na uwagę zasługuje fakt, że w publikacjach nr 5 i 6 Pan A. Kołodziej jest autorem korespondencyjnym. Publikacje o nr 8-10 przedstawiają wyniki badań metabolomicznych próbek nowotworu pęcherza moczowego z zastosowaniem nowo wytworzonych targetów pokrytych nanocząsteczkami. Udział procentowy mgr inż. A. Kołodzieja w tych pracach jest na poziomie 9 i 14%. Zastosowanie LDI-MS pozwoliło na identyfikację związków o najwyższej różnicy intensywności pomiędzy obszarami zdrowymi i chorymi. Wykorzystanie MSI pozwala na określenie położenia potencjalnych biomarkerów nowotworowych na powierzchni badanej tkanki. Wyniki publikacji są niezwykle ważne z punktu widzenia aplikacji metody zaprezentowanej w pracy do szybkiej diagnostyki nowotworów. Moje pytanie dotyczy stopnia zaangażowania Doktoranta w badania prezentowane w tych trzech ostatnich publikacjach. Biorąc pod uwagę jego dość niski udział procentowy oraz dość lakoniczny opis udziału merytorycznego, proszę o szczegółowe wyjaśnienie zakresu badań jakie prowadził Doktorant w publikacjach o nr 8-10. Dodatkowo w pracy doktorskiej istnieją nieścisłości dotyczące zakresu badań Pana A. Kołodzieja. Mianowicie, w zakresie pracy (str. 15) Doktorant opisuje, że określił limity wykrywalności związków biologicznych z zastosowaniem układów  $^{109}\text{AgNPET}$ ,  $\text{AuNPET}$  i  $\text{AgLGN}$  oraz wykorzystał te układy do obrazowania spektrometrią mas. Na str. 25 napisane jest, że nanocząsteczkami złota zajmowała się w swojej pracy doktorskiej Pani mgr inż. Aneta Płaza-Altamer, w tabelach przedstawiający procentowy udział Doktoranta w zakresie badań wymienione są nanocząstki Ag. Proszę o ścisłe określenie zakresu badań Doktoranta. Rozumiem, że badania wykonywane były w ramach projektów, w zespole wieloosobowym, stąd ścisły podział obowiązków i zakresu badań jest czysto bardzo trudny. Niemniej w pracy doktorskiej ten zakres badań powinien być bardzo szczegółowo podany, np. w tabeli

określającej udział merytoryczny Doktoranta w przygotowaniu publikacji. Proszę o doprecyzowanie tej kwestii.

Jednocześnie pragnę podkreślić, że współautorstwo Pana A. Kołodzieja w 10 publikacjach, oraz w dwóch kolejnych przygotowanych do druku, jest bardzo cenne i właściwe w kontekście rozwoju kariery naukowej. Świadczy to o dużym, w skali światowej, znaczeniu badań nad nowymi sposobami przygotowania targetów do analiz z wykorzystaniem spektrometrii mas z laserową desorpcji/ionizacją oraz ich istotnym znaczeniu w rozwoju nowych metod analitycznych. Dodatkowo Pan A. Kołodziej prezentował wyniki swoich badań na krajowych i zagranicznych konferencjach naukowych. Prowadzenie badań przez młodych naukowców w zespole, które prężnie pozyskuje środki na badania ze źródeł zewnętrznych oraz efektywnie i regularnie publikuje wyniki swoich badań, jest znakomitym doświadczeniem dla młodego naukowca. Jestem przekonana, że Pan A. Kołodziej, który już posiada świetny dorobek naukowy, będzie wkrótce zdolny do samodzielnego pozyskiwania funduszy na prowadzenie badań oraz prowadzenia ich w zespole współpracowników.

Wracając do merytorycznych kwestii dotyczących doktoratu Pana mgr inż. A. Kołodzieja stwierdzam, że rozprawa doktorska jest spójnym zbiorem 10 publikacji naukowych. Oceniana rozprawa doktorska, która jest przewodnikiem po publikacjach zawiera 55 strony, składa się z: wykazu publikacji wchodzących w skład cyklu, streszczenia, abstraktu w języku angielskim, wykazu stosowanych skrótów, celu i zakresu pracy, wstępu, omówienia publikacji wchodzących w skład pracy doktorskiej, podsumowania i wniosków, spisu literatury, przedstawienia dorobku naukowego Doktoranta, deklaracji współautorów i oświadczeń o procentowym udziale w publikacjach oraz kopii 10 publikacji stanowiących rozprawy doktorską. Doktorant wyraźnie nakreślił cel badań, tj.: (a) opracowanie nowej metody syntezy nanocząstek do laserowej spektrometrii mas i badanie możliwości ich zastosowania do modyfikacji płytek ze stali nierdzewnej (targetów), oraz (b) określenie możliwości zastosowania wytworzonych targetów do analizy związków biologicznie czynnych z wykorzystaniem spektrometru masowego z laserową desorpcją/ jonizacją. We wstępie Doktorant odniósł się do najnowszych doniesień w zakresie tematu badań oraz umotywował potrzebę podjęcia tematyki badań. W dalszej części doktoratu zaprezentowany jest syntetyczny opis wyników badań i ich dyskusja oraz wnioski końcowe. Badania naukowe Doktorant rozpoczął od syntezy nanocząstek, które scharakteryzowane powszechnie uznawanymi do tego celu metodami, czyli metodą spektroskopii absorpcyjnej w zakresie UV/Vis, DLS (metoda dynamicznego rozpraszania światła) oraz SEM (skaningową mikroskopią elektronową). Moje pytanie: jakie ograniczenia mogą mieć matryce z nanocząsteczkami? Czy i w jak dużym stopniu

zjawiska wynikające z niejednorodności zsyntezowanych nanocząstek (rozmiar, kształt) wpłyną na powtarzalność wyników? Czy wyklucza to zastosowanie takich nanomaterii do analiz mikrobiologicznych? Materiał badawczy został właściwie dobrany, a były nim wzorcowe związki z grupy kwasów karboksylowych, hydroksykarboksylowych, aminokwasów, mykotoksyn, kwasów tłuszczowych oraz złożone matryce (odcisk palca, osocze krwi, tkanki nowotworowe i zdrowe). Tak szeroki dobór materiału do badań pozwolił na prowadzenie badań pozwalających na określenie limitów wykrywalności i oznaczalności oraz porównanie uzyskanych wyników z obecnie stosowanymi metodami w analizie tych związków np. LC-MS. Następnie przejście do próbek złożonych pozwoliło na potwierdzenie użyteczności opracowanych targetów pokrytych nanocząsteczkami do analizy próbek rzeczywistych, a tym samym podkreślić aspekt aplikacyjny uzyskanych wyników badań. W publikacjach będących podstawą doktoratu zastosowano szereg właściwych metodologicznie metod badawczych, tj. wspomaganą matrycą laserową desorpcję/ jonizację sprzężoną ze spektrometrią mas (MALDI-MS), analizator czasu przelotu (MALDI-ToF), obrazowanie spektrometrią mas (MSI), spektrometrię atomową emisyjną z indukcyjnie sprzężoną plazmą (ICP-OES), spektrometr masowy z jonizacją w elektrospaju wyposażony w kwadrupol i analizator czasu przelotu (ESI-QTOF MS), magnetyczny rezonans jądrowy (NMR) i inne. Biorąc pod uwagę przedstawiony merytoryczny udział w publikacjach (str. 39-42) Doktorant samodzielnie stosował metody MALDI-MS, SEM oraz metody syntezy nanocząstek wykorzystując laserową ablację? Proszę o sprecyzowanie tej kwestii. Podsumowanie i wnioski zawarte na str. 31 i w publikacjach są kompletne, właściwe i wynikają bezpośrednio z prowadzonych badań. Literatura cytowana w pracy doktorskiej jest aktualna, dobrana prawidłowo, zróżnicowana i bogata. Doktorant wykazał się bardzo dobrą wiedzą w zakresie realizowanej problematyki. Ponadto przedstawione w publikacjach rysunki i wykresy są czytelne i na wysokim poziomie. Analiza statystyczna wyników właściwa. Mimo to Doktorant nie uniknął kilku drobnych błędów w części opisowej doktoratu, np.:

- str. 15, 4 linia od dołu, jest: „analizy płynów biologicznych z wykorzystaniem..”, powinno być: „analizy płynów biologicznych z wykorzystaniem..”,

- str. 20, 10 linia od dołu: podawane są wyniki badań Tanaki i zesp., ale brak odnośnika literaturowego,

- str. 37, linia 8 od góry: brak podanego czasopisma; linia 4 od dołu: brak podanego źródła finansowania projektu.

Jednak te drobne błędy, które nie są błędami merytorycznymi, w żadnym stopniu nie umniejszają wysokiej jakości rozprawy doktorskiej.

Podsumowując stwierdzam, że praca doktorska mgr inż. Artura Kołodzieja jest na bardzo wysokim poziomie merytorycznym i stanowi doskonały wstęp do dalszych badań nad rozwojem technik pomiarowych z wykorzystaniem spektrometrii masowej z laserową desorpcją/ionizacją w obrazowaniu materiałów biologicznych. Pragnę podkreślić, że jestem pod ogromnym wrażeniem zakresu badań, użytej specjalistycznej aparatury, współpracy z ośrodkami naukowymi w kraju i za granicą, udziału w projektach naukowych oraz dorobku naukowego jaki Doktorant zgromadził podczas 4 lat. Te doświadczenia prognozują znakomity dalszy rozwój naukowy Doktoranta i samodzielne prowadzenie przez niego prac naukowych w przyszłości.

**Biorąc pod uwagę powyższe moja recenzja doktoratu mgr inż. Artura Kołodzieja jest zdecydowanie pozytywna. Praca spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z 20 lipca 2018 r. art. 187 (Dz.U. 2018 r. poz. 1668 ze zmianami). Dlatego wnioskuję do Rady Dyscypliny Wydziału Chemicznego Politechniki Rzeszowskiej o dopuszczenie mgr inż. Artura Kołodzieja do dalszych etapów przewodu doktorskiego.** Jednocześnie, biorąc pod uwagę bardzo wysoki poziom merytoryczny rozprawy, szeroki zakres wykonanych badań oraz ich znaczenie podstawowe i aplikacyjne, a także dorobek publikacyjny Doktoranta wnioskuję do Wysokiej Rady o jej wyróżnienie.

