

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR INŻ. ARTURA KOŁODZIEJA PT. „SYNTEZA I BADANIA NANOSTRUKTUR WSPOMAGAJĄCYCH LASEROWĄ SPEKTROMETRIĘ MAS”

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska została wykonana w Katedrze Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Rzeszowskiej im. Ignacego Łukasiewicza pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Tomasza Rumana specjalisty z laserowej spektrometrii mas i obrazowania MS materiałów biologicznych ze szczególnym uwzględnieniem ludzkich tkanek nowotworowych.

Celem niniejszej rozprawy było opracowanie nowej metody syntezy nanocząstek do laserowej spektrometrii mas, badanie ich właściwości oraz wykorzystanie ich do modyfikacji powierzchni płytek ze stali nierdzewnej. Otrzymane płytki, pokryte nanocząstkami, wykorzystano następnie do analizy różnych związków chemicznych oraz mieszanin, w tym biologicznych z wykorzystaniem spektrometrii mas z laserową desorpcją/ionizacją.

Zakres pracy obejmował:

- Badania literaturowe w tematyce metod stosowanych w laserowej spektrometrii mas ze szczególnym uwzględnieniem metod bezmatrycowych;
- Opracowanie nowej metody syntezy nanocząstek wykorzystując metodę laserowej ablacji;

- Analizę efektywności desorpcji/ionizacji związków testowych za pomocą płytek pokrytych zawiesiną nowo wytworzonych nanocząstek ^{109}Ag ;
- Określenie limitów wykrywalności związków biologicznych z wykorzystaniem układów $^{109}\text{AgNPET}$, AuNPET oraz $^{109}\text{AgLGN}$;
- Wykorzystanie układów $^{109}\text{AgNPET}$, AuNPET oraz $^{109}\text{AgLGN}$ do obrazowania spektrometrią mas;
- Analizy płynów biologicznych z wykorzystaniem układów pokrytych nanocząstkami metali;
- Badania metaboliczne z zastosowaniem nowo wytworzonych targetów (płytek ze stali nierdzewnej) pokrytych nanocząstkami.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska składa się z cyklu dziesięciu monotematycznych artykułów opublikowanych w latach 2020-2023 uzupełnionych 27 stronicowym opracowaniem. Do dokumentacji dołączone zostały pełne teksty artykułów. Prace te zostały opublikowane w czasopismach z listy filadelfijskiej (Advances in Medical Sciences -1, IF= 3,287, MNiSW=100, Cytowania -0, International Journal of Mass Spectrometry -1, IF=1,986, MNiSW=70, Cytowania-2, Journal of Mass Spectrometry -2, IF=2,394, MNiSW=70, Cytowania-6, Journal of Pharmaceutical Analysis -1, IF=14,026, MNiSW=140, Cytowania -2, Rapid Communications in Mass Spectrometry-1, IF=2,586, MNiSW=70, Cytowania - 0, Scientific Reports -1, IF=4,996, MNiSW=140, Cytowania-0, i Toxins -1, IF=S,075, MNiSW=100, Cytowania-8 oraz w nowych czasopismach (ACS Measurement Science Au-1, Cytowania -8 i Chemical Technology and Biotechnology -1, Cytowania -0). Jego publikacje cytowane były 27 razy. Wszystkie artykuły ukazały się w czasopismach których



sumaryczny impact factor wynosi 36,744 (ilość punktów MNiSW wynosi 740) co daje średnią 3,67 na publikacje. Jest również współautorem 2 artykułów przekazanych do druku, 2 artykułów w monografiach konferencyjnych, 1 wykładu prezentowanego na konferencji międzynarodowej i 1 wykładu prezentowanego na konferencji krajowej. Doktorant był wykonawcą w dwóch projektach grantowych finansowanych przez NCN pt., „Poszukiwanie oraz charakterystyka biomarkerów raka pęcherza” nr umowy UMO-2018/31D/ST400109 i „Dwu i trójskładnikowe kompleksy jonów srebra z kwasem N-fenylantranilowym, niflumowym oraz mefenamowym jako nowa alternatywa dla antybiotyków”. Brał udział w szkoleniu pt., „Innowacyjne rozwiązania do hodowli komórek ssaczych” Merck Sp. Zo.o. Rzeszów 16.10.2019 oraz w wydarzeniach organizowanych przez Wydział Chemiczny Politechniki Rzeszowskiej takich jak Noc Odkrywców, Nocne Spotkania z Nauką, Problemy Chemii i w wyjazdach do szkół średnich w ramach promocji nowych kierunków studiów na Wydziale Chemicznym. Mimo, że przedstawiona rozprawa porusza szeroki wachlarz wątków jej czytelność jest dobra, a redakcja całości poprawna. Praca napisana jest starannie i jest poprawna pod względem merytorycznym.

Recenzowana rozprawa ma charakter zarówno poznawczy jak i przede wszystkim aplikacyjny o szerokim zakresie, a uzyskane przez Doktoranta wyniki mogą znaleźć zastosowanie w analityce związków małocząsteczkowych oraz materiałów pochodzenia biologicznego ze szczególnym uwzględnieniem ludzkich tkanek nowotworowych za pomocą spektrometrii mas z laserową ablacją. Technika MALDI-laserowej desorpcji /jonizacji wspomaganą matrycą jest jedną z najpopularniejszych metod analizy różnego typu próbek z



wykorzystaniem spektrometrii mas. Zastosowanie w tej technice popularnych matryc organicznych takich jak np. kwas α - cyjano-4-hydroksycynamonowy (CHCA), kwas 2,5-dihydroksybenzoesowy (DHB) oraz kwas synapinowy nie pozwala na skuteczną analizę ilościową ze względu na występowanie szeregu ograniczeń. Pierwszym z nich jest znalezienie matrycy w której anality rozpuszczają się, a następnie wspólnie z matrycą krystalizują na powierzchni płytki. Następnym problemem jest niehomogeniczna krystalizacja na powierzchni plamki, powodująca powstanie na płytce „sweet spotów”. Ponadto w/w technika nie pozwala na osiągnięcie wysokiej czułości pomiaru analitu w zakresie $m/z < 1000$ ze względu na liczne sygnały matrycy o bardzo wysokiej intensywności. Wraz z gwałtownym rozwojem metod otrzymywania nanocząstek zaczęto zastępować nimi matryce organiczne. Najpopularniejszymi nanostrukturami stosowanymi w analityce związków małowczątkowych stały się nanocząstki metaliczne (Co, Ag, Au, Pt, Pd), materiały porowate (np. TiO_2 , Al_2O_3), nanostruktury na bazie krzemu (Si, Si_3N_4) oraz nanomateriały na bazie węgla (grafen, nanorurki węglowe, diamentopodobny węgiel amorficzny, nanodrutki diamentowe domieszkowane borem i inne). Jak wynika z badań profesora Tomasza Rumana i współpracowników zastosowanie nanocząstek srebra a zwłaszcza monoizotopowego ^{109}Ag lub złota pozwala na wytwarzanie sygnałów o dużej powtarzalności, eliminowanie potencjalnych interferencji jonów matrycy z jonami analitu oraz istnieje możliwość wewnętrznej kalibracji z wykorzystaniem sygnałów jonów srebra lub złota. Wykazano, że użycie monoizotopowego srebra -109 w laserowej spektrometrii mas zwiększa około dwukrotnie intensywność sygnałów w porównaniu do mieszaniny izotopów srebra 107 i 109. Inną zaletą jest dobra zdolność do jonizacji związków o niskiej



polarności np. lipidów oraz silne właściwości przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze srebra. Nanosrebro jest efektywnym czynnikiem niszczącym szerokie spektrum bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich, wirusów (w tym wirusa HIV-1 i grypy) oraz niektórych grzybów. Znane są mechanizmy działania nanosrebra na różnego typu mikroorganizmy. Umożliwia to zabezpieczenie analitu przed wzrostem mikroorganizmów na jego powierzchni, co mogłoby wpływać na wyniki oznaczeń.

Doktorant w rozprawie skoncentrował się na następujących zagadnieniach: detekcji i analizie ilościowej wzorców związków z wykorzystaniem układów $^{109}\text{AgNPET}$ oraz AuNPET (artykuły 1 i 2), nowymi metodami syntezy nanocząstek ^{109}Ag oraz Au z wykorzystaniem laserowej ablacji w rozpuszczalniku (Artykuły 3 i 4), analizie związków małowcząsteczkowych z wykorzystaniem $^{109}\text{AgLGN}$ (Artykuły 5, 6 i 7) oraz analizie metabolicznej próbek nowotworu pęcherza moczowego (Artykuły 8, 9 i 10).

W artykule 1 przedstawiono porównanie efektywności opracowanych metod do detekcji kwasów karboksylowych takich jak: jabłkowy, pimelinowy, azelainowy, 3-metylohipurowy, palmitowy, linoleinowy, oleinowy, arachidonowy, arachidowy oraz erukowy z wykorzystaniem nanocząstek złota i srebra-109. Określono limit wykrywalności i oznaczalności dla metod AuNPET oraz $^{109}\text{AgNPET}$. Kolejnym etapem było odpowiednie przygotowanie płytek ze stali nierdzewnej pokrytych otrzymanymi metodą redukcji chemicznej nanocząstkami srebra -109 oraz złota. Następnie roztwory w/w kwasów naniesiono na przygotowane płytki z wykorzystaniem metody wysychającej kropli, a płytki po wyschnięciu analitu wprowadzono do spektrometru



masowego MALDI-ToF. Wykazano, że w wyniku analizy na płytce wzbogaconej nanocząstkami złota udało się oznaczyć pięć (jabłkowy, pimelinowy, azelainowy, 3-metylohipurowy i arachidowy) z dziesięciu oznaczanych kwasów karboksylowych, z kolei na płytce z nanosrebrem ^{109}Ag wszystkie badane związki. Stwierdzono, że dla $^{109}\text{AgNPET}$ badane kwasy karboksylowe można było odnaleźć na widmie głównie w postaci adduktów z ^{109}Ag a ich intensywność była znacznie wyższa od analogicznych związków dla AuNPET. Wykazano, że najwyższe intensywności badanych kwasów otrzymano dla stężenia $100\mu\text{g/ml}$. Na podkreślenie zasługuje fakt, że po raz pierwszy w literaturze określono limity detekcji oraz oznaczalności dla sześciu z dziesięciu analizowanych kwasów karboksylowych metoda laserowej spektrometrii mas.

W artykule 2 przedstawiono analizy jakościową oraz ilościową mykotoksyn na materiałach budowlanych z wykorzystaniem płytek $^{109}\text{AgNPET}$, AgNPET oraz AuNPET w porównaniu do metody MALDI. Próbką analizowaną była mieszanina siedmiu wzorców mykotoksyn pleśni (o określonym stężeniu) takich jak: patulina, cytrynina, kwas nitropropionowy, alternariol, sterymatocystyna, kwas cyklopiazonowy i roquefortyna C. Oznaczano również w/w związki po ich ekstrakcyjnym wydzieleniu z płyty gipsowo-kartonowej. Uzyskane rezultaty ekstrakcyjnego wydzielenia w/w mykotoksyn z materiału budowlanego wskazywały na możliwość wykorzystania opracowanych metod $^{109}\text{AgNPET}/\text{AgNPET}$ jako alternatywę do aktualnie stosowanych sposobów identyfikacji.

W artykułach 3 i 4 omówiono metody laserowego wytwarzania i zastosowania chemicznie czystych nanocząstek srebra-109 i złota. Określono



optymalne parametry syntezy nanocząstek srebra oraz sposobu ich wykorzystania w analizie związków. Następnie płytki poddano analizie metodą MALDI-ToF MS, w czasie której badano intensywność sygnałów ^{109}Ag i jego adduktów oraz obliczono stosunek intensywności zanieczyszczeń do sygnałów srebra- 109. Po tym etapie naniesione zostały związki testowe, które poddano badaniom MS. Zawiesiny o odpowiednim składzie były nanoszone poprzez nebulizację na płytki stalowe. Właściwości otrzymywanych nanocząstek ^{109}Ag i Au scharakteryzowano za pomocą spektrofotometru UV-Vis oraz dynamicznego rozpraszania światła (DLS). Określono wielkość w/w nanocząstek za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej o wysokiej rozdzielczości (HR SEM). Przeprowadzono również badania nanocząstek za pomocą spektrofotometrii UV-Vis. Określone długości fali światła wywołując oscylację elektronów powodują efekt znany jako powierzchniowy rezonans plazmowy, który związany jest zarówno z rozmiarem i kształtem nanocząstek jak ich otoczeniem chemicznym. Uzyskane wyniki pozwoliły na określenie sferycznego kształtu i średniej wielkości nanocząstek srebra -109 za pomocą LASiS. W kolejnych etapach analizowano jonowe i niejonowe związki wzorcowe takie jak: ryboza, histydyna, tymidyna oraz poli(tlenek etylenu). Wykazano, że zastosowanie płytek z $^{109}\text{AgLGN}$ pozwala na kilkudziesięciokrotne obniżenie błędów m/z eksperymentalne- m/z teoretyczne w stosunku do metody MALDI. Kolejnym obiektem badań był bardzo ważny dla analizy kryminalistycznej odcisk palca z wyraźnymi śladami linii papilarnych. Badania te miały na celu identyfikację związków egzogennych i endogennych zawartych na ludzkim palcu. Przygotowanie próbki do analizy za pomocą MSI wymagało jedynie dotknięcia palcem powierzchni płytki stalowej. Następnie na otrzymany odcisk napyłano



zawiesiny $^{109}\text{AgLGN}$ na powierzchnię. Stosując płytki pokryte $^{109}\text{AgLGN}$ zidentyfikowano ponad 30 różnych związków w odcisku palca, które należały do grup takich jak proste sole nieorganiczne (NaCl, KCl), proste związki organiczne (mocznik, aminokwasy, kwasy karboksylowe o krótkim łańcuchu węglowym) oraz kwasy tłuszczowe i lipidy.

W artykule 5 omówiono wyniki porównania metod LDI MS oraz MSI w analizie ilościowej sześciu kwasów karboksylowych takich jak : azelainowy, 3-metylohipurowy, oleinowy, linoleinowy, arachidowy oraz erukowy. Roztwory w/w kwasów nanoszono na płytkę pokrytą $^{109}\text{AgLGN}$, pomiar odbywał się z wykorzystaniem aparatu MALDI-ToF w dwóch trybach: ręcznego pomiaru 4 punktów na plamce oraz obrazowanie całej plamki z substancją badaną. Ponadto określono wpływ oddziaływania innych związków znajdujących się w próbce na oznaczanie badanych kwasów karboksylowych (tzw. efekt matrycy). W artykule 5 przedstawiono wartości LOD i LLOQ określone dla oznaczanych kwasów karboksylowych. Wykazano, że dzięki wykorzystaniu płytek pokrytych nanocząstkami otrzymanymi metodą LGN można uzyskać od dwu -do pięciokrotnie niższe wartości granicy wykrywalności i dolnej granicy oznaczalności niż w przypadku kiedy zastosowano nanocząstki ^{109}Ag otrzymane za pomocą metody chemicznej redukcji. Analiza ilościowa pozwoliła na wyznaczenie równań linii trendu na wykresach prezentujących logarytm stężenia vs logarytm intensywności. Wykazano, że w przypadku czterech z sześciu analizowanych kwasów karboksylowych dopasowanie linii trendu wynosiło ok. 0,96 w zakresie tysiąckrotnej zmiany stężenia, natomiast dla kwasu azelainowego otrzymano linie trendu z dopasowaniem powyżej 0,99 dla wszystkich siedmiu stężeń, co odpowiadało 1000000-krotnej zmianie jego



stężenia. Dodatkowo przeprowadzona analiza strzał-do-strzału oraz miejsce - do-miejsca wykazała dużą powtarzalność wyników dzięki użyciu $^{109}\text{AgLGN}$. Stwierdzono, że wykorzystując MSI w takich analizach generowane są również obrazy jonowe badanych próbek, które wskazują na niejednorodne rozmieszczenie analitu na powierzchni całej plamki.

W artykule 6 oznaczano kwasy 3-hydroksykarboksylowe będące jednym z głównych składników lipidu A, budującego lipidową część endotoksyn odpowiedzialnych za toksyczność bakterii Gram-ujemnych. Zastosowano po raz pierwszy w literaturze metodę laserowej spektrometrii mas oraz nanocząstek do oznaczania kwasów 3-hydroksykarboksylowych. Związki te analizowano w zakresie od 1 mg/ml do 1ng/ml. Stwierdzono dużą użyteczność nanocząstek Ag-109 w ilościowym oznaczaniu kwasów 3-hydroksykarboksylowych za pomocą spektrometrii mas w bardzo szerokim zakresie stężeń nawet do 1 ng/ml (np. dla kwasu 3-hydroksydodekanowego). Wykazano również, że w porównaniu do LDI MS w większości przypadków wyniki otrzymane za pomocą MSI/charakteryzowały się lepszym dopasowaniem do linii trendu i dawały współczynnik korelacji równy 0,98 dla większości badanych kwasów. Oznaczono również za pomocą MSI surowicy krwi wzbogaconą kwasem 3-hydroksykarboksylowym w celu określenia wpływu matrycy biologicznej. Otrzymane wyniki wykazały duży wpływ matrycy zarówno na detekcję jak i oznaczanie zawartości kwasów: 3-hydroksydodekanowego, 3-hydroksyheksadekanowego i 3- hydroksyoktadekanowego.

Przedmiotem przedstawionych badań w artykule 7 była analityka wybranych aminokwasów. Jak wynika z danych literaturowych zawartość aminokwasów w organizmie człowieka zmienia się w zależności od rodzaju



spożywanego pokarmu lub stanu zdrowia. Stwierdzono, że zarówno zbyt wysokie jak i zbyt niskie stężenie aminokwasów w organizmie człowieka może świadczyć o zaburzeniach metabolicznych lub rozwijających się chorobach. Zaprezentowano wyniki oznaczeń za pomocą MSI aminokwasów takich jak: lizyna, fenyloalanina, izoleucyna i alanina. Dla każdego badanego aminokwasu wykonano wykresy z dopasowaniem czterech rodzajów linii trendu: liniowej, eksponentyjnej, potęgowej oraz wielomianowej. Wykazano na podstawie wartości współczynników R^2 najlepsze dopasowanie, którym w przypadku w/w aminokwasów była regresja wielomianowa. Przedstawiono również wyniki oznaczeń stężeń badanych aminokwasów w krwi za pomocą obrazowania spektrometrią mas.

W artykułach 8-10 na szczególne podkreślenie z punktu widzenia diagnostycznego zasługuje porównanie wyników MSI obszarów nowotworowych tkanek pacjentów chorujących na nowotwór pęcherza moczowego z wykorzystaniem układów $^{109}\text{AgNPET}$. Rak pęcherza moczowego jest dziesiątym najczściej rozpoznawalnym nowotworem. Nowotwór ten nie wykazuje charakterystycznych objawów, więc zarówno diagnoza jak i monitorowanie pacjentów pozostaje wyzwaniem. Aktualnie cytoscopia oraz cytologia moczu są najczystszyimi metodami stosowanymi w rozpoznawaniu tej choroby. Jak wynika z danych literaturowych Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków zatwierdziła sześć testów moczu do wykorzystania klinicznego w połączeniu z cytoskopią. Trzy z nich są wykorzystywane do diagnostyki i monitorowania raka pęcherza moczowego (białko jądrowe - 22(NMP22), NMP22 Bladder-Chek, UroVysion), a pozostałe trzy zostały



dopuszczone do monitorowania raka pęcherza moczowego (immunocyt (UCyt+), BTA-TRAK, BTA-STAT).

Od wielu lat poszukiwane są nieinwazyjne metody diagnostyki raka pęcherza moczowego w oparciu o biomarkery oraz nowe testy. W przypadku biomarkerów raka pęcherza moczowego na podkreślenie zasługuje krążący miR-18a należący do grupy małych niekodujących RNA, które biorą udział w progresji nowotworów. W 2020 roku Wang i współpracownicy (Clin Biochem., 2020,S0009-9120(20)30921) stwierdzili, że poziom miR-18a był podwyższony w tkankach raka pęcherza moczowego człowieka. Wykazali, że ekspresja miR-18 w osoczu była ściśle związana z typem nowotworu, stopniem zaawansowania, stadiem TNM(klasyfikacja służąca do określenia stopnia zaawansowania klinicznego nowotworu) i jego wielkością. Byli oni pierwszymi badaczami, którzy określili potencjalną wartość diagnostyczną miR-18a osocza i tkanek w raku pęcherza moczowego. Wykazali również, że poziomy miR-18a w tkance guza korelują z jego poziomami w osoczu. Analiza statystyczna krzywej oceny jakości klasyfikatora tkanek nowotworowych i zdrowych wykazała 90,4% czułości i 90,1% swoistości. Jak wynika z danych literaturowych cytoscopia i cytologia, nie zostały jeszcze zastąpione w praktyce klinicznej, ponieważ badane markery oferują niewystarczającą czułość i swoistość w wykrywaniu nowotworów pęcherza moczowego. Komórki raka pęcherza moczowego mogą wydzielać enzymy, specyficzny zestaw białek i egzosomy, aby regulować swoje mikrośrodowisko, wpływając na przeżycie i progresję nowotworu, co jest także potencjalnym źródłem biomarkerów. Z całej grupy nowych testów do nieinwazyjnego wykrywania nowotworów pęcherza moczowego na szczególną uwagę zasługują następujące: ONCURIA™



(wieloskładnikowy test immunologiczny oparty na pomiarze stężenia 10 analitów takich jak: angiogenina, apolipoproteina, alfa-1-antytrypsyna, anhidraza węglanowa 9, interleukina 8, metalopeptydaza macierzy pozakomórkowej 9, metalopeptydaza macierzy pozakomórkowej 10, inhibitor aktywatora plazminogenu 1, syndekan 1, oraz czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego), Xpert Bladder Cancer (jest ukierunkowany na wykrycie pięciu mRNA takich jak: CRH, IGF2, UPK1B, ANX10 i ABL1, które mogą, ulegać nadekspresji w przypadku raka pęcherza moczowego), ADXBLADDER(to nowy dostępny test immunoenzymatyczny wykorzystujący przeciwciała przeciwko białku kodującemu minichromosom 5 do wykrywania raka pęcherza moczowego), Bladder EpiCheck test (stosowany do badania moczu oparty na reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym, która wykrywa zmiany metylacji DNA związane z nowotworem pęcherza moczowego w panelu 15 biomarkerów genomowych) oraz UroMuTERT (stosowany do wykrywania mutacji TERT, które są najczystszyimi zmianami genetycznymi nowotworu pęcherza moczowego). Większość aktualnie stosowanych testów opiera się na oznaczeniu pojedynczego czynnika specyficznego dla danego typu nowotworu. Z tego też względu dalsze prace nad nowymi metodami diagnostycznymi powinny koncentrować się na połączeniu kilku proponowanych testów.

W artykule 8 przedstawiono porównanie rezultatów badań MSI obszarów zdrowych i nowotworowych tkanek pacjentów chorych na raka pęcherza moczowego z wykorzystaniem układów $^{109}\text{AgNPET}$. Ponadto wykonano jedno- i wielowymiarową analizę statystyczną badanych tkanek. Pierwszym etapem było przeprowadzenie ekstrakcji badanych związków za pomocą mieszaniny metanol/ chloroform oraz metanol/woda. Następnie uzyskane ekstrakty poddano



odrębnej analizie z wykorzystaniem płytki $^{109}\text{AgNPET}$ w spektrometrze MALDI- ToF/ToF. Zidentyfikowano aż 28 związków o najwyższej różnicy intensywności pomiędzy uśrednionymi obszarami zdrowymi oraz nowotworowymi. Na podkreślenie zasługuje fakt, że wykorzystywanie analiz statystycznych pozwoliło na wyodrębnienie 10 nowych potencjalnych biomarkerów raka pęcherza moczowego. Kolejnym etapem badań było przeprowadzenie analizy MSI wyciętego guza oraz fragmentu przylegającego do niego zdrowego nabłonka dróg moczowych. Wykonano także odciski tkanek nowotworowych i kontrolnych na płytkach, a następnie za pomocą zestawu do nebulizacji napyłano wytworzone w wyniku reakcji redukcji nanocząstki srebra -109. Przygotowane w ten sposób próbki analizowano za pomocą MSI. Otrzymane obrazy jonowe potwierdziły możliwość wykorzystania tej metody jako narzędzia diagnostycznego zarówno do identyfikacji biomarkerów nowotworowych jak i do określenia ich lokalizacji na powierzchni badanej tkanki. W kolejnym artykule 9 przedstawiono rezultaty analizy metabolicznej celowanej i niecelowanej za pomocą NMR, LDI-MS oraz ICP-OES dwustu próbek ludzkiej surowicy krwi (100 pacjentów chorych na nowotwór pęcherza moczowego i 100 zdrowych ochotników). Wyniki otrzymane poddano wielowymiarowej analizie statystycznej, w której wskazano 4 biomarkery zidentyfikowane za pomocą NMR. Analiza ICP-OES wykazała, że obecność litu oraz żelaza odróżnia próbki kontrolne od nowotworowych, podczas gdy za pomocą LDI-MS stwierdzono obecność 25 związków różnicujących dane próbki. Ponadto wykazano, że dzięki wykorzystaniu w/w metod instrumentalnych możliwe było także rozróżnienie stopnia zaawansowania nowotworu pęcherza moczowego. Cykl artykułów kończy publikacja 10, która



przedstawia rezultaty analizy 100 próbek surowicy krwi pacjentów chorych na raka oraz 100 kontrolnych od zdrowych ochotników za pomocą UHPLC sprzężonej z ESI-UHR-QTOF-MS + MS/MS (ultra-wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z spektrometrem mas z jonizacją w elektrospreju wyposażonym w kwadrupol i analizator czasu przelotu). Pierwszym etapem było przygotowanie ekstraktów surowic. W tym celu zastosowano ekstrakcję solwentową, umożliwiło to otrzymanie dwóch faz: górnej zawierającej przede wszystkim związki polarne oraz dolnej, w skład której wchodzi głównie lipidy. Uzyskane dane poddano analizie składowej głównej oraz analizie dyskryminacyjnej ortogonalnych cząstkowych najmniejszych kwadratów. Dzięki tym analizom udało się wyodrębnić 27 metabolitów, które różnicowały próbki kontrolne od nowotworowych. Wykazano również, że 23 metabolity obecne w surowicy rozróżniają pacjentów chorych na raka pęcherza moczowego o niskim i wysokim stopniu złośliwości oraz grupy kontrolną. Znalezione także 37 metabolitów w surowicy krwi różnicujących etapy nowotworu pęcherza moczowego.

Rozprawy mgr inż. Artura Kołodzieja należy ocenić pod kątem zawartych w niej rezultatów badań jako źródła eksperymentalnych danych, które wraz z przedstawioną interpretacją przyczyniają się do dalszego rozwoju analityki związków małowcząsteczkowych oraz materiałów pochodzenia biologicznego ze szczególnym uwzględnieniem tkanek nowotworowych. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorant w pełni opanował szereg nowoczesnych technik instrumentalnych i otrzymał nowe wyniki istotne zarówno z poznawczego jak i przede wszystkim aplikacyjnego punktu widzenia. Reasumując przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia wymogi stawiane przez art. 179 ustawy z



dnia 3 lipca 2018 roku oraz przepisy wprowadzające ustawy-Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2018 r. z dnia 30 sierpnia 2018 r. art. 219).

Biorąc powyższe pod uwagę stawiam wniosek Radzie Dyscypliny Inżynieria Chemiczna Politechniki Rzeszowskiej o dopuszczenie Pana mgr inż. Artura Kołodzieja do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie w przekonaniu o wysokiej wartości merytorycznej rozprawy opartej o 10 artykułów w czasopismach z listy filadelfijskiej o sumarycznym $IF= 36,744$ (ilości punktów $MNiSzW=760$) zawierającej istotne elementy nowości naukowej oraz aktywnym udziale w realizacji dwóch projektów naukowo-badawczych wnioskuje o Jej wyróżnienie.

Lublin 20.07.2023



prof. dr hab. Zbigniew Hubicki

