

Prof. zw. dr hab. Włodzimierz Lewandowski  
Politechnika Białostocka  
Katedra Chemii, Biologii i Biotechnologii

**Recenzja rozprawy doktorskiej  
mgr inż. Anety Płazy-Altamer  
pt. Spektrometria mas z laserową ablacją do badania związków  
małocząsteczkowych oraz materiałów pochodzenia biologicznego  
wykonywanej pod promotorstwem prof. dr hab. inż. Tomasza Rumana**

Generalnym celem analizowanej rozprawy doktorskiej były badania nad rozwinięciem możliwości analitycznych spektrometrii mas z laserową ablacją oraz szukanie jej dalszych aplikacji w różnych dziedzinach naukowych, a w szczególności w biologii i medycynie. Spektrometria mas z laserową ablacją jest nowoczesną metodą analityczną szczególnie stosowaną do badania materiałów biologicznych oraz syntetycznych.

W porównaniu do innych technik, takich jak  $^{109}\text{AgNPET}$  LOI (spektrometria mas targetu wzbogaconego nanocząstkami srebra monoizotopowego wspomaganą przez laser desorpcją/ionizacją), technologia LARESI SRM MSI ma kilka znaczących zalet. Przede wszystkim, pozwala na bezpośrednią analizę próbek o zróżnicowanych rozmiarach, kształtach i stanach fizycznych bez konieczności stosowania wstępnej obróbki, takiej jak nałożenie matrycy, odwodnienie czy derywatywacja. To pozwala na zachowanie anatomicznej integralności próbki, zmniejsza ryzyko delokalizacji analitów oraz kontaminacji chemicznej. Próbki nie są wystawione na działanie próżni, co ogranicza możliwość deformacji. Ta deformacja mogłaby prowadzić do przesunięć masowych wykrywanych jonów - istotnego problemu w przypadku instrumentów opartych na analizatorach TOF działających w próżni. Zastosowanie technologii LARESI SRM MSI umożliwia utrzymanie próbki w stanie zamrożonym, co zapobiega utracie wody i tym samym zachowuje integralność próbki.

W swej pracy Doktorantka przedstawiła wyniki obrazowania wycinków ludzkich tkanek nerek z częścią prawidłową i nowotworową za pomocą nowoczesnej metody Infrared Laser Ablation-Remote Electrospray Ionization (LARESI MSI). Związki zawarte na powierzchni badanego obiektu zidentyfikowano poprzez pomiar w trybie SRM/MRM. Kolejne zaprezentowane wyniki stanowiły obrazy jonowe wygenerowane dla odcisków fragmentów ludzkich tkanek pęcherza moczowego uzyskane w wyniku obrazowania spektrometrią mas z laserową desorpcją/ionizacją. Do pomiaru wykorzystano napyłone na badany obiekt nanocząstki  $^{109}\text{Ag}$  wytworzone metodą redukcji chemicznej.

Szczegółowym celem rozprawy doktorskiej mgr inż. Anety Płazy-Altamer było opracowanie metodologii pomiarowej pozwalającej na badanie rozkładu powierzchniowego małocząsteczkowych związków chemicznych na różnorodnych powierzchniach oraz możliwości jej zastosowania do analizy wybranych obiektów.

W ramach pracy doktorskiej przeprowadzono przegląd literatury dotyczący spektrometrii mas laserowej ablacji (LDI) oraz tematyki obrazowania spektrometrią mas (MS). Opracowano metodę obrazowania wykorzystującą Laser Ablation-Remote Electrospray Ionization MSI (LARESI MSI). Przeprowadzono analizę MS materiałów

Biologicznych i syntetycznych. Wytwarzano nanocząstki złota i srebra monoizotopowego metodą Laser-Generated Nanomaterials (LGN) przy użyciu impulsowego lasera światłowodowego z galwanometrem 2-osiowym (PFL 20 GS). Wykorzystano je w laserowej dyspersji/ionizacji LDI MS oraz LDI MSI. Przeprowadzono również analizę ilościową wybranych grup związków zużyciem płytki modyfikowanej nanocząstkami srebra (109AgNPs). Z kolei profilowanie metaboliczne surowicy krwi pacjentów z nowotworem pęcherza moczowego przeprowadzono za pomocą LDI MS i ultrawysokorozdzielczej chromatografii cieczowej sprzężonej z ultrawysokorozdzielczą spektrometrią mas z jonizacją elektrosprejem (UHPLC-ESI-UHRMS+MS/MS).

Mgr inż. Aneta Płaza-Altamer dokonała optymalizacji metody LARESI MSI. Zastosowanie lasera podczerwonego oraz zewnętrznej komory ablacyjnej umożliwiło wykonanie eksperymentu obrazowania w warunkach ciśnienia atmosferycznego. Z kolei na podstawie badań literaturowych dotyczących nowotworu nerki z powodzeniem przeprowadzono analizę celowaną wycinka tkanki nerki ludzkiej objętej nowotworem, dokonując pomiaru LARESI SRM MSI. Obrazowanie spektrometrią mas odcisków wycinków tkanek pęcherza moczowego na powierzchni modyfikowanej nanocząstkami 109Ag pozwoliło na wygenerowanie obrazów jonowych metabolitów znajdujących się na ich powierzchni. Wykazały one zróżnicowanie pomiędzy obszarem tkanki prawidłowej a nowotworowej.

Ponadto opracowanie metody wytwarzania laserowo nanocząstek pozwoliło na otrzymanie chemicznie czystych nanocząstek w sposób prosty i szybki. Brak konieczności stosowania związków metali, związków redukcyjnych czy stabilizatorów dodatkowo pozwolił na obniżenie poziomu tła chemicznego na widmie masowym, zwiększając czułość metod LDI oraz upraszczając jego interpretację. Po raz pierwszy do ablacji nanocząstek z metalowej płytki Doktorantka wykorzystała impulsowy laser światłowodowy z galwanometrem 2-osiowym. Wykonane badania UV-Vis, OLS oraz HR SEM pozwoliły określić rozmiar i kształt wytworzonych nanocząstek. Użyteczność wytworzonych nanocząstek 109Ag Doktorantka potwierdziła za pomocą pomiaru wielu związków testowych metodą LDI MS i eksperymentów LDI MSI. Kolejne badania przeprowadzone z użyciem nanocząstek 109Ag generowanych laserowo wskazują na ich przydatność do jakościowej i ilościowej analizy aminokwasów, kwasów karboksylowych oraz kwasów 3-hydroksykarboksylowych. Wytworzone laserowe nanocząstki złota i srebra monoizotopowego z powodzeniem zastosowano do analizy metabolicznej surowicy krwi pacjentów nowotworowych i zdrowych. Wyniki pomiarów LDI MS, NMR, ICP-OES i UHPLC-ESI-UHRMS+MS/MS wielu próbek surowicy pozwoliły na wytypowanie metabolitów różnicujących pacjentów nowotworowych od zdrowych, również umożliwił rozróżnienie stadiów choroby.

Doktorantka wraz ze współautorami opisała swoje badania w 9 publikacjach w renomowanych czasopismach znajdujących się w bazie JCR. W trzech publikacjach jest pierwszym autorem. Jej udział w realizacji materiału naukowego większości prac (tzn. w 7 publikacjach) wynosi od 14 do 25%, zatem jest znaczący. Wymienione publikacje mają wysokie IF wynoszące od 1,934 nawet do 14,026. Dla tych publikacji sumaryczny IF (2023r.) wynosi 63,797 natomiast ocena MEiN wynosi 700 punktów.

Pierwszy artykuł (I) stanowiący element rozprawy doktorskiej, ukazuje potencjał platformy LARESI SRM/MRM MSI w wykrywaniu markerów nowotworowych na próbkach nerek pacjentów z rakiem. Przedstawia on solidne podstawy do dalszych badań uzasadniając rozwój tej metody w kontekście diagnostyki onkologicznej.

Ponadto, artykuł porównuje metody  $^{109}\text{Ag}$ NPET LDI MSI i MALDI MSI, wyróżniając zalety pierwszej z nich, takie jak brak potrzeby stosowania matrycy, wyższą prędkość tworzenia obrazów i lepszą rozdzielczość, a także zwraca uwagę na nowoczesną metodę LARES SRM MSI, która pozwala na bezpośrednią analizę różnorodnych próbek bez potrzeby wstępnej obróbki, zachowując ich integralność anatomiczną i umożliwiając precyzyjną analizę za pomocą protonacji. Nanocząstki, które otrzymano za pomocą syntezy laserowej zostały opisane w kontekście analizy jakościowej i ilościowej aminokwasów, kwasów karboksylowych i kwasów 3-hydroksykarboksylowych. Ilościowe oznaczenia kilku aminokwasów (alaniny, izoleucyny, lizyny i fenyloalaniny) w materiale biologicznym z wykorzystaniem nanocząstek srebra-109 opisano w artykule opublikowanym w *International Journal of Mass Spectrometry* (**publikacja III**). Artykuły dotyczące wykorzystania nanocząstek  $^{109}\text{Ag}$  w technikach LDI MS i półautomatycznego MSI do pomiarów ilościowych kwasów karboksylowych (**publikacja IV**) oraz kwasów 3-hydroksykarboksylowych (**publikacja VIII**) wskazują na większą precyzję MSI w porównaniu do tradycyjnej metody MALDI. Publikacja II dotyczyła przygotowania nanocząstek srebra-109 i ich zastosowania w analizach LDI-MSI dla tkanek nerki z nowotworem, identyfikując różnicujące metabolity. W publikacji V, Doktorantka opisuje przygotowanie nanocząstek złota i ich zastosowanie w analizach LDI MS dla aminokwasów i polimerów. Natomiast praca IX koncentrowała się na analizie metabolitów i obrazowaniu spektrometrią mas za pomocą LDI-MSI w przypadku raka pęcherza moczowego, identyfikując 10 metabolitów różnicujących tkanki nowotworowe od zdrowych. Badanie opublikowane w *Scientific Reports* (**publikacja VI**) skupiające się na identyfikacji biomarkerów metabolomicznych w próbie 100 pacjentów dostarcza obiecujących wyników, jego moc statystyczna i możliwość generalizacji mogą być ograniczone przez stosunkowo małą liczbę próbek. Znaczenie dużej, demograficznie zróżnicowanej populacji próbkowej jest kluczowe w badaniach metabolomicznych, aby zapewnić szerokie ujęcie oraz wiarygodność wyników. Dalsze badania na większych próbach i z uwzględnieniem różnorodności demograficznej są zatem zdecydowanie wskazane.

Mimo wysokiego poziomu badań, istnieją pewne mankamenty, które warto byłoby rozważyć. Niektóre techniczne aspekty pracy mogą być bardziej komunikatywne dla czytelników niezaznajomionych ze wszystkimi szczegółami badania. Sugerowałbym rozwinięcie wszystkich skrótów już przy pierwszym użyciu, a także rozbudowę wykazu stosowanych skrótów.

Zdanie "*Spadek stężenia aminokwasów wskazuje na zwiększone zapotrzebowanie na te związki podczas wzrostu nowotworu, a to z kolei wiąże się ze zwiększoną intensywnością glikolizy, będącej głównym źródłem energii dla komórek nowotworowych*" jest tylko częściowo prawidłowe, ponieważ komórki nowotworowe faktycznie mają zwiększone zapotrzebowanie na aminokwasy, co może prowadzić do spadku ich stężenia, jednakże to zapotrzebowanie jest związane głównie z procesem glutaminolizy, a nie bezpośrednio z glikolizą, która jest odrębnym, choć również kluczowym, procesem metabolicznym w komórkach nowotworowych. Wyrażenie "*badania literaturowe wymienionych metabolitów wykazały ich powiązanie z rozwojem nowotworów*" jest niepełne bez konkretnych informacji na temat natury tego powiązania. Kluczowe jest uściślenie, czy określone metabolity są zwiększone lub zmniejszone w nowotworach, jakie role spełniają w metabolizmie nowotworowym. Informacje o udziale doktorantki w organizacji "Nocnego Spotkania z Nauką" mogłyby zawierać więcej szczegółów o Jej wkładzie w popularyzację nauki. Nazwa wydarzenia

nie dostarcza jednoznacznej informacji o charakterze przedsięwzięcia. Oczywiście te drobne negatywne uwagi nie zmieniają faktu, iż pracę oceniam bardzo pozytywnie.

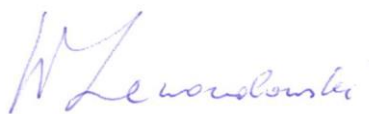
Podsumowując, moja ocena pracy doktorskiej jest wyjątkowo pozytywna i rekomenduję jej wyróżnienie z następujących powodów:

1. Doktorantka podjęła się badania tematu o fundamentalnym znaczeniu, który ma potencjalne zastosowania zarówno w badaniach podstawowych, jak i aplikacyjnych, co może mieć istotne znaczenie dla walki z nowotworami.
2. Przeprowadzone badania przyczyniły się do poszerzenia globalnej wiedzy w tej dziedzinie.
3. Wyniki badań zostały opublikowane w prestiżowych, międzynarodowych czasopismach naukowych.
4. Doktorantka efektywnie współpracowała z ośrodkami naukowymi w kraju i za granicą, w tym z Montana State University (USA) oraz Federal University of Ouro Preto (Brazylia).
5. Swoją rozprawę napisała w sposób bardzo staranny.

Podkreślam, że wszystkie te elementy razem świadczą o wyjątkowym wkładzie Doktorantki w dziedzinę i zasługują na szczególne uznanie.

Podsumowanie:

Zdaniem recenzenta praca spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668). Wnoszę zatem, aby Wysoka Rada dopuściła mgr Anetę Płaza-Altamer do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z przyjemnością stawiam też wniosek o wyróżnienie przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej mgr inż. Anety Płazy-Altamer.



Prof. dr hab. Włodzimierz Lewandowski