

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR INŻ. ANETY PŁAZA-ALTAMER PT.,,
SPEKTROMETRIA MAS Z LASEROWĄ ABLACJĄ DO BADANIA ZWIĄZKÓW
MAŁOCZĄSTECZKOWYCH ORAZ MATERIAŁÓW POCHODZENIA
BIOLOGICZNEGO"

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. inż. Tomasza Rumana specjalisty z laserowej spektrometrii mas i obrazowania MS materiałów biologicznych ze szczególnym uwzględnieniem ludzkich tkanek nowotworowych.

Celem niniejszej rozprawy było opracowanie metodologii pomiarowej pozwalającej na badania rozkładu powierzchniowego małowcząsteczkowych związków chemicznych na różnorodnych powierzchniach oraz możliwości jej zastosowania do analizy wybranych obiektów.

Zakres pracy obejmował następujące etapy badawcze:

1. Badania literaturowe tematyki spektrometrii mas z laserową ablacją
2. Badania literaturowe tematyki obrazowania spektrometrią mas
3. Opracowanie metody obrazowania wykorzystującej LARESI MSI
4. Obrazowanie za pomocą MS materiałów biologicznych i syntetycznych:
 - a) obrazowanie wycinka tkanki nerki z obszarem nowotworowym z wykorzystaniem metody LARESI MSI
 - b) obrazowanie tkanki nowotworowej pęcherza moczowego z wykorzystaniem nanocząstek srebra-109
 - c) obrazowanie odcisku palca z wykorzystaniem $^{109}\text{AgNPs}$ wytworzonych za pomocą PFL 2D LGN
5. Wytwarzanie nanocząstek złota i srebra monoizotopowego metodą syntezy laserowej, ich charakterystyka (UV-Vis, DLS) i zastosowanie do LDI MS oraz LDI MSI.
6. Analiza ilościowa wybranych grup związków z wykorzystaniem $^{109}\text{AgNPs}$ wytworzonych za pomocą PFL 2 D LGN metodami LDI MS oraz LDI MSI
7. Profilowanie metaboliczne surowicy krwi pochodzącej od pacjentów z nowotworem pęcherza moczowego za pomocą metod LDI MS i UHPLC-ESI-UHRMS+ MS/MS.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska składa się z cyklu dziewięciu monotematycznych artykułów opublikowanych w latach 2021-2023 uzupełnionych 37 stronicowym opracowaniem. Do dokumentacji dołączone zostały pełne teksty artykułów. Prace te zostały opublikowane w czasopiśmie z listy filadelfijskiej (Advances in Medical

Sciences -1, IF= 2.852, Punkty MEiN-140, Cytowania -0, Analytical Chemistry -1, IF=8.008, Punkty MEiN -140, Cytowania -14, International Journal of Mass Spectrometry -1, IF=1,934, MEiN=70, Cytowania -2, Journal of Mass Spectrometry -1, IF=2,394, Punkty MEiN=70, Cytowania -0, Journal of Pharmaceutical Analysis -1, IF=14,026, Punkty MEiN=140, Cytowania -2, Rapid Communication in Mass Spectrometry -1, IF=2,586, Punkty MEiN=70, Cytowania -0, i Scientific Reports -1, IF=4,997, Punkty MEiN=140, Cytowania -1) oraz w nowych czasopismach (ACS Measurement Science Au- Cytowania -8 i Chemical Technology and Biotechnology -Cytowania -0) Jej publikacje cytowane były 27 razy. Wszystkie artykuły ukazały się w czasopismach których sumaryczny impact factor wynosi 36,756 (ilość punktów Ministerstwa Edukacji i Nauki wynosi 700) co daje średnio ok. 4.088 na publikację. Jest również współautorką- 2 publikacji przekazanych do druku, 2 artykułów w monografiach konferencyjnych oraz 1 wykładu prezentowanego na studenckiej międzynarodowej konferencji. Doktorantka była wykonawcą w projekcie grantowym finansowanym przez NCN pt., „Poszukiwanie oraz charakterystyka biomarkerów raka pęcherza” nr umowy UMO-2018/31/D/ST4/00109. Brała udział w następujących szkoleniach: „Kompetencje, obowiązki i zadania kierownictwa w laboratorium zgodnie z wymaganiami normy PN-EN ISO/IEC 17025: 2018-2 w drodze do akredytacji” - szkolenie online, 25-26.10.2021r. „Kompetencje laboratorium w rozumieniu wymagań normy PN-EN ISO/IEC 17025:2018-02” - szkolenie online PCA, 23-25.11.2021r. i „Podstawowe zagadnienia z zakresu Polskich Norm i dokumentów normalizacyjnych” - szkolenie online PKN, 30.06.2022r. oraz w organizacji V Nocnego Spotkania z Nauką na Wydziale Chemicznym 18.10.2019r., VI Nocnego Spotkania z Nauką na Wydziale Chemicznym 14.10.2022r. i w wyjazdach do szkół średnich w ramach promocji nowych kierunków studiów na Wydziale Chemicznym PRz. 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 językowym i graficznym, a proporcje pomiędzy zagadnieniami o charakterze podstawowym i opisem badań własnych zostały właściwie wyważone.

Recenzowana rozprawa ma charakter zarówno badań podstawowych jak i aplikacyjnych o szerokim zakresie, a uzyskane przez Doktorantkę wyniki mogą znaleźć zastosowanie w analityce związków małowcząsteczkowych oraz materiałów pochodzenia biologicznego ze szczególnym uwzględnieniem ludzkich tkanek nowotworowych za pomocą spektrometrii mas z laserową ablacją. Część literaturowa rozprawy omawia wartościowy przegląd 92 dobrze dobranych odnośników literaturowych z których 67 opublikowane jest w ciągu ostatnich dziesięciu lat. Cytowania literaturowe i jej właściwy dobór świadczy o tym, że Doktorantka bardzo dobrze orientuje się w aktualnym stanie dotyczącej zarówno wykorzystania spektrometrii mas z laserową ablacją do badania wybranych związków małowcząsteczkowych i materiałów pochodzenia biologicznego jak i diagnostyki nowotworowej. W ciągu ostatnich kilkunastu lat zaobserwowano rozwój spektrometrii masowej. Do rozwoju tej techniki analitycznej przyczyniło się opracowanie łagodnych metod jonizacji do których można zaliczyć m.in. techniki laserowej desorpcji /jonizacji -LDI, laserowej desorpcji /jonizacji wspomaganą matrycą MALDI, laserowej desorpcji jonizacji wspomaganą nanostrukturami NALDI, laserowej desorpcji/jonizacji wspomaganą powierzchnią SALDI oraz powierzchniowo wzmocnionej laserowej desorpcji/jonizacji SELDI.



Proces ablacji laserowej polegający na usuwaniu materiału z ciała stałego za pomocą promieniowania elektromagnetycznego emitowanego przez laser znajduje liczne zastosowania m.in. do: produkcji nanomateriałów, w osadzaniu cienkich warstw metalicznych i dielektrycznych w spawalnictwie do łączenia części metalowych, do oczyszczania powierzchni oraz w medycynie. Laserowa spektrometria mas ze względu na szereg zalet takich jak m.in. brak konieczności stosowania skomplikowanych procedur na etapie przygotowania próbki, niewielkie ilości próbki oraz bardzo krótki czas znajduje szerokie zastosowanie w analityce związków pochodzenia naturalnego i syntetycznego. Jedną z najczęściej stosowanych technik wykorzystujących LDI jest MALDI. Zalicza się ją do miękkich metod jonizacji ze względu na fakt, że w większości przypadków w wyniku jonizacji nie dochodzi do degradacji badanej substancji o dużej masie cząsteczkowej oraz niekontrolowanej fragmentacji w źródle jonów. Innym podejściem jest LDI z wykorzystaniem obrazowania spektrometrią mas (MSI), która pozwala na analizy i wizualizację rozkładu powierzchniowego związków w szerokim zakresie mas cząsteczkowych w złożonych układach z dobrą specyficznością molekularną. Rosnące zainteresowanie technikami MSI wynika z możliwości zdobycia danych dotyczących lokalizacji związków w badanym materiale, co czysto przyczynia się do poznania jego funkcji i właściwości. Jedną z najpopularniejszych metod obrazowania molekularnego jest spektrometria mas z laserową desorpcją /jonizacją wspomaganą matrycą-MALDI-MSI, którą z powodzeniem stosowano m.in. do wizualizacji i analizy powierzchniowego rozkładu białek lub lipidów w materiale biologicznym. Laserowa desorpcja /jonizacja wspomaganą nanostrukturami (NALDI) pełniących rolę powszechnie stosowanych matryc organicznych do procesu LDI pozwala na analizy związków małowielkościowych poprzez znaczne ograniczenie występujących interferencji w niskim zakresie m/z. Z tego względu technika ta jest chętnie stosowana w metabolomice i lipidomice. Kolejną techniką jest SALDI w której do pochłaniania energii lasera zastosowano cienką warstwę cząstek węgla aktywnego unieruchomioną na podłożu aluminiowym. Wykazano, że warstwa ta nie zakłóca sygnałów pochodzących od analitu. Jedną z najważniejszych metod zaliczanych do SALDI opartych o nanostruktury krzemu jest DIOS. Metody tą stosowano do analizy związków chemicznych o masie od 150 do 12000Da. Stosowano ją do oznaczania m.in. glikolipidów, peptydów, cukrów, kwasów tłuszczowych oraz białek. Stwierdzono, że najlepsze rezultaty w pomiarach DIOS osiągalne są dla analitów poniżej 3000Da. Jak wynika z danych literaturowych zastosowanie DIOS MS pozwala na wykrycie femto- a nawet attomolowych ilości badanego związku. Następną techniką jest SELDI powierzchniowo wzmocniona laserowa desorpcja/jonizacja polegająca na wykorzystaniu specjalistycznych macierzy o nazwie ProteinChip, które zawierają chemicznie lub biochemicznie modyfikowane powierzchnie. Płytki stosowane w tej technice występują m.in. jako podłoża wykorzystujące oddziaływania hydrofobowe, hydrofilowe, jonowe, kowalencyjne oraz oddziaływania typu antygen-przeciwciało, które wchodzi w interakcję z białkami, kwasami nukleinowymi względnie z innymi cząsteczkami o określonych właściwościach fizykochemicznych..

Do analizy MSI materiałów pochodzenia roślinnego, zwierzęcego i ludzkiego Stosowane są różnego rodzaju nanostruktury. W literaturze opisano dwie wiodące kategorie metod otrzymywania nanostruktur: takie jak bottom up (metody osadzania z fazy gazowej, metody osadzania wspomaganie plazmą, metody epitaksji z wiązki chemicznej, metody



epitaksji z fazy gazowej z użyciem związków metaloorganicznych, metody koloidalne, metody zol-żel i metody elektrolityczne) oraz top-down (mielenie, litografia). Metody bottom-up opierają się na badaniu materii od podstaw czyli „atom po atomie”. Poprzez wybór odpowiedniej materii wyjściowej (atomy, cząsteczki lub cząstki koloidalne) można wpływać na właściwości produktu finalnego. Natomiast otrzymywanie nanostruktur za pomocą metod top-down polega na zastosowaniu mechanizmu przeciwnego. Ich główną cechą jest rozdrabnianie materiału w taki sposób aby jego rozmiar zawarty był w przedziale od 1 do 100 nm. Realizacja tych metod wiąże się z równoczesną zmianą wymiarowości wyjściowych struktur, co nie następuje w przypadku produktów bottom up. Właściwości powierzchniowe nanostruktur odgrywają istotną rolę w determinowaniu aktywności chemicznej, przewodności elektrycznej i cieplnej oraz wytrzymałości, a specyficzne właściwości powierzchniowe nadają im niezwykle właściwości katalityczne odmienne od materiałów litych. Stwierdzono, że nanocząstki metali rozproszone w fazie ciekłej charakteryzują się intensywnym zabarwieniem. Jest ono charakterystyczne dla nanosuspensji. Pochodzenie barwy przypisuje się zjawisku zbiorowej oscylacji elektronów powierzchniowych materii rozproszonej. Drgania elektronowe, które są nazwane powierzchniowym rezonansem plazmowym ściśle wiążą się z kształtem i wielkością nanocząstek. Częstotliwość plazmonową cechuje wysoka czułość na skład, rozmiar, kształt nanocząsteczek i odległość między nimi. Zostało wykazane również, że wraz ze zmniejszaniem się rozmiaru nanocząstek następuje przesunięcie pasma absorpcyjnego w stronę ultrafioletu. 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. Do otrzymywania nanocząsteczek srebra zastosowano metody takie jak: ablacja laserowa, metoda w luku elektrycznym, redukcja chemiczna, redukcja fotochemiczna, napromieniowanie mikrofalowe, rozkład termiczny oraz szereg metod biologicznych w których wykorzystuje się bakterie, drożdżaki, grzyby (grzyby pleśniowe), glony oraz rośliny wyższe. Najbardziej popularną metodą chemicznej syntezy nanometali jest redukcja ich jonów. Na drodze redukcji możliwe jest otrzymywanie nanocząstek różnych metali jako trwałych koloidów zdyspergowanych w środowisku wodnym lub rozpuszczalnika organicznego. Jako reduktory w procesie syntezy nanocząstkowych koloidów metali przejściowych stosowane są m.in. alkohole alifatyczne, cukry, cytryniany, formalina, glicerol, hydrazyna, kwas askorbinowy, tetrahydroborany sodu i potasu oraz wodór. Wykazano, że rodzaj stosowanego reduktora ma wpływ na wielkość otrzymanych nanostruktur. Zastosowanie silnych reduktorów jakimi są np. tetrahydroborany sodu lub potasu skutkuje syntezą małych monodispersyjnych nanocząstek. Natomiast wykorzystanie np. cytrynianu, który jest stosunkowo słabym reduktorem prowadzi do otrzymywania nanometali o stosunkowo dużych rozmiarach. Wykazano, że w przypadku stosowania redukcji chemicznej do otrzymywania nanocząstek srebra pojawiają się problemy z czystością otrzymywanych produktów wynikające ze stosowania substancji do reakcji chemicznych, takich jak prekursorzy metali, reduktory czy stabilizatory, które są źródłem jonów związanych z odczynnikami dającymi liczne sygnały na widmach masowych. W/w problemy rozwiązuje zastosowanie syntezy za pomocą ablacji laserowej w roztworze (LASiS) do otrzymywania czystych nanocząstek. Synteza ta pozwala na otrzymanie nanocząstek bez stosowania



stabilizatorów i reduktorów, dzięki czemu uzyskany produkt charakteryzuje się wysoką czystością chemiczną. Stosowane w rozprawie nanocząstki srebra monoizotopowego $^{-109}$ oraz złota otrzymano za pomocą światłowodowego lasera impulsowego z dwuwymiarowym skanerem galwanometrycznym (PFL 2D-GS). Pokazano ich charakterystykę wraz z wynikami prezentującymi użyteczność w laserowej spektrometrii mas do analizy jakościowej i ilościowej różnych związków chemicznych. W pracy doktorskiej zastosowano nanocząstki ^{109}Ag i Au do analizy LDI MS nowotworu pęcherza moczowego.

Doktorantka w rozprawie skoncentrowała się na zagadnieniach związanych z ablacją laserową materiału biologicznego metodą LARESI MS, obrazowaniem tkanki nowotworowej pęcherza moczowego z wykorzystaniem nanocząstek srebra $^{-109}$, wykorzystaniem do badań nanocząstek Au i ^{109}Ag wytwarzanych za pomocą LASIS, zastosowaniem laserowo wytworzonych nanocząstek ^{109}Ag do analizy ilościowej wybranych związków metodami LDI MS i LDI MSI oraz profilowaniem metabolicznym surowicy krwi w raku pęcherza moczowego za pomocą LDI MS i UHPLS-ESI-UHRMS + MS/MS.

W artykule I przedstawiono **po raz pierwszy w literaturze wykorzystanie ablacji laserowej ze zdalną jonizacją przez elektrorozpylanie LARESI w analizie rozkładu związków małowcząsteczkowych na powierzchni wybranych obiektów testowych**. W celu zademonstrowania możliwości wykorzystywania tej techniki w analizie materiału biologicznego wykonano celowane obrazowanie MS/MS w trybie SRM zamrożonych ludzkich tkanek nerki pozyskanych od pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem nerki. Badane tkanki zawierały część nowotworową oraz fragment sąsiedniej zdrowej tkanki. Celowaną analizę przeprowadzono dla wybranych metabolitów, które powinny występować w znacznie większej ilości w tkance rakowej w porównaniu do tkanki normalnej. Wytypowanymi do analizy związkami były aminokwasy, nukleozydy, zasady nukleinowe, witaminy oraz niektóre związki małowcząsteczkowe wskazywane w literaturze jako potencjalne biomarkery raka nerki. Najlepsze wyniki obrazowania otrzymano dla 10 aminokwasów, witaminy E, guaminy, urydyny, tyminy, inozyny oraz mleczanu. Wykazano, że związkami, które w największym stopniu różnicowały (tkankę zdrową i nowotworową) były: seryna, kwas glutaminowy, histydyna i fenyloalanina. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że opracowana metoda LARESI umożliwia wizualizację rozkładu powierzchniowego związków małowcząsteczkowych na różnych powierzchniach z dużą czułością, specyficznością, krótkim czasem analizy oraz uproszczonym sposobem przygotowania próbki. Stwierdzono, że brak konieczności odwadniania lub derywatyzacji przed analizą pozwala zachować anatomiczną integralność próbki, zmniejszając ryzyko delokalizacji analitów i jej zanieczyszczenia chemicznego. Wykazano również, że laserowa ablacja prowadzona w warunkach ciśnienia atmosferycznego eliminuje deformacje obiektu pojawiającą się w przypadku działania wysokiej próżni w aparatach MS. **Zastosowanie tej techniki było zarówno pierwszym w literaturze z obrazowaniem przestrzennego usieciowania guaminy, urydyny, tyminy oraz inozyny w obrębie ludzkich tkanek nerki jak i jej wykorzystania w obrębie materiału biologicznego pod kątem wskazania potencjalnych biomarkerów raka nerki**. W następnym artykule IX zajmowano się alternatywną techniką do obrazowania wycinków tkanek, którą jest wykonanie ich odcisków na odpowiednich powierzchniach, a następnie przeprowadzanie eksperymentu MSI. W/w metoda pozwala na analizy związków powierzchniowych badanego obiektu bez ingerencji w jego struktury. Materiał ten może być



wykorzystany ponownie do dalszych analiz wymagających homogenizacji lub ekstrakcji. Przedmiotem badań były wycinki tkanek pęcherza moczowego pobrane od 6 pacjentów. Materiałem kontrolnym były niewielkie fragmenty stanowiące minimalny margines tkanki zdrowej wokół nowotworu. Odciski wszystkich wycinków wykonano na stalowej płytce modyfikowanej nanocząstkami ^{109}Ag przygotowanej według określonej procedury. Dodatkowo na każdy odcisk napyłono zawiesinę ^{109}Ag wytworzoną za pomocą chemicznej redukcji trifluoroctanu srebra-109 z kwasem 2,5-dihydroksybenzoesowym. W ten sposób przygotowane obiekty umieszczono w spektrometrze masowym gdzie wykonywano obrazowanie. Uzyskane wyniki pozwoliły na wytypowanie dziesięciu metabolitów (glicyna, glutamina, hipotauryna, 3-metylobutanol, fosforan etylu, miosmina, PI(22:O/O:O), aminopental, N,N-dimetyloprolina i metyloguanidyna) o wysokim potencjale diagnostycznym i zdolności do rozróżnienia tkanek zdrowych od nowotworowych u pacjentów mających raka pęcherza moczowego. Wykazano, że zastosowanie nanosrebra 109 w obrazowaniu ludzkiej tkanki pęcherza moczowego techniką LDI MS pozwoliło na detekcję i identyfikację związków na powierzchni obiektu badanego. Otrzymano kilkadziesiąt obrazów jonowych dla wyselekcjonowanych związków prezentujących największe zróżnicowanie intensywności sygnałów pomiędzy obszarem nowotworowym a prawidłowym. Za pomocą analizy statystycznej wytypowano dziesięć metabolitów zdolnych do odróżnienia tkanki prawidłowej od nowotworowej, które mogą być potencjalnymi biomarkerami. W artykułach II i V przedstawiono metodę laserowego wytwarzania i zastosowania chemicznie czystych nanocząstek srebra-109 i złota. Uzyskane wyniki prezentują zastosowanie impulsowego lasera światłowodowego (PFL) z głowicą galvoskanera do generowania nanocząstek z powierzchni blaszki metalu. Stwierdzono, że zastosowane metod MS w oparciu o izotop ^{109}Ag pozwala na uzyskanie sygnału analitów o ok. 2-krotnie większej intensywności w porównaniu z mieszaniną izotopów srebra. Ponadto sygnały oparte na izotopie ^{109}Ag mają wyższy stosunek sygnału do szumu S/N. Inne zalety to wysoka powtarzalność i tolerancja na obecność zanieczyszczeń takich jak sole. Zaletą użycia nanocząstek Au jest wysoka jonizacja związków polarnych i mniejsza intensywność klastrów złota umożliwiająca pomiary śladowych ilości związków. Analogicznie jak w przypadku srebra -109 istnieje możliwość wewnętrznej kalibracji widma MS w oparciu o sygnały pochodzące od klastrów złota. Ablację powierzchni blaszki ^{109}Ag lub Au zanurzonej w odpowiednim rozpuszczalniku przeprowadzono za pomocą światłowodowego lasera z głowicą skanera galwanometrycznego. Określono optymalne warunki wytwarzania nanocząstek m.in. takie jak: dobór rozpuszczalnika, częstotliwość lasera, moc lasera oraz prędkość skanowania za pomocą LDI MS. Otrzymane nanocząstki ^{109}Ag i Au scharakteryzowano za pomocą spektrofotometru UV-Vis oraz dynamicznego rozpraszania światła (DLS). Określono wielkość optymalnych nanocząstek za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej o wysokiej rozdzielczości (HR SEM). Przeprowadzono także badania nanocząstek za pomocą spektrofotometrii UV-Vis. Określone długości fali światła wywołując oscylacje elektronów powodują efekt znany jako powierzchniowy rezonans plazmowy, który związany jest zarówno z rozmiarem i kształtem nanocząstek jak ich otoczeniem chemicznym. Z tego też względu technika spektrofotometrii UV-Vis jest pomocna w określaniu wielkości i kształtu nanocząstek. Uzyskane wyniki pozwoliły na określenie sferycznego kształtu i średniej wielkości nanocząstek srebra -109 za pomocą LASiS. Badanie dynamicznego rozpraszania światła,



wykazało, że w zawieszynie znajduje się najwięcej nanocząstek o średnicy ok. 30 nm, z rozrzutem o wielkości w zakresie od 20-100nm. W następnym etapie badań w/w nanocząstki wytworzone za pomocą LASiS użyto jako matryce w analizie LDI MS. Do pomiarów LDI MS użyto jako związków testowe histydyny, rybozę tymidyny oraz poli (glikol propylenowy) umieszczone na stalowej płytce na które napyłono zawieszinę nanocząstek Ag-109 z wykorzystaniem zestawu do nebulizacji (artykuł II). Stwierdzono że w porównaniu z MALDI wyniki otrzymane dla kilku związków małowcząsteczkowych z laserowo wytworzonymi nanocząstkami dają mniejsze błędy dopasowania m/z. Ponadto określono również przydatność nanocząstek srebra -109 otrzymanych za pomocą PFL 2D GSLASiS do obrazowania MS. 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 eksperymentu MSI wymagało jedynie dotknięcia palcem powierzchni płytki ze stali nierdzewnej. Następnie na uzyskany odcisk napyłono zawieszinę nanocząstek srebra-109 a następnie wykonano pomiar LDI MSI.

Uzyskane wyniki pozwoliły na identyfikację 33 związków takich jak sole nieorganiczne (KCl, NaCl), proste związki organiczne (mocznik, aminokwasy, kwasy karboksylowe o krótkich łańcuchach), kwasy tłuszczowe, lipidy i inne. Wszystkie w/w związki są endogenne. W artykule V przedstawiono możliwości wykorzystania otrzymanych laserowo nanocząstek do detekcji związków małowcząsteczkowych za pomocą LDI MS na przykładzie wybranych aminokwasów i poli (glikolu propylenowego). Stwierdzono, że nanocząstki ^{109}Ag i Au otrzymane za pomocą impulsowego lasera światłowodowego mogą być wykorzystane w metodzie MS wspomaganą nanocząstkami laserowej desorpcji/ jonizacji (nano PALDI MS). Wykazano, że metoda ta, w porównaniu z syntezą chemiczną jest znacznie szybsza. Na podkreślenie zasługuje fakt, że płytka ze srebra -109 lub złota może być wielokrotnie stosowana. Nanocząstki otrzymane za pomocą laserowej syntezy użyto do analizy jakościowej i ilościowej aminokwasów (artykuł III), kwasów karboksylowych (artykuł IV) i kwasów hydroksykarboksylowych (VIII). Jak wynika z danych literaturowych zawartość aminokwasów w organizmie człowieka zmienia się w zależności od spożywanego pokarmu lub stanu zdrowia. Zarówno zbyt wysokie jak i zbyt niskie stężenie aminokwasów w organizmie człowieka może świadczyć o zaburzeniach metabolicznych lub rozwijających się chorobach. Z tego powodu konieczne jest oznaczanie stężenia aminokwasów w organizmie ludzkim. W artykule (I) wykonano oznaczenia wybranych aminokwasów takich jak alanina, izoleucyna, lizyna i fenyloalanina w materiale biologicznym za pomocą nanocząstek ^{109}Ag generowanych laserowo (LGN) do LDI MS oraz LDI MSI. Naniesiono roztwory aminokwasów oraz 500 krotnie rozcieńczoną wodą próbkę surowicy krwi na płytkę stalową na którą następnie napyłono zawieszinę nanocząstek ^{109}Ag generowanych światłowodowym laserem impulsowym. Najpierw wykonano pomiar LDI MS dla każdej plamki a następnie eksperyment MSI. Aminokwasy oznaczano w szerokim zakresie stężeń 1mg/ml do 1 ng/ml. Przeprowadzono również analizę regresji otrzymanych danych dotyczących intensywności w funkcji stężenia. Wykazano, że w przypadku wszystkich stosowanych aminokwasów najlepsze dopasowanie uzyskano z użyciem regresji wielomianowej, gdzie wartość współczynnika korelacji R^2 wynosiła powyżej 0,90. Wyjątek stanowił wynik otrzymany metodą MALDI dla izolocyny, gdzie wartość R^2 wynosiła 0.43. Tak duże różnice w



intensywności sygnału mające wpływ na wartość współczynnika korelacji są efektem ręcznego wyboru punktów pomiarowych. Zastosowanie techniki MSI do ilościowego oznaczania aminokwasów pozwoliło na uzyskanie znacznie lepszego wyniku korelacji R^2 niż za pomocą manualnych pomiarów LDI MS. Opublikowane wyniki potwierdzają dużą przydatność nanocząstek ^{109}Ag uzyskanych za pomocą metody PFL 2D GS LSN w oznaczaniu aminokwasów w materiale biologicznym. W artykule IV przedstawiono rezultaty analizy ilościowej z wykorzystaniem ^{109}Ag LGN następujących kwasów karboksylowych: azelainowy, 3-metylohipurowy, oleinowy, arachidowy i erukowy. Kwasy te uczestniczą w procesach metabolicznych w organizmie człowieka lub mogą się przyczyniać do rozwoju różnych chorób. Dla każdego kwasu karboksylowego wykonano krzywą wzorcową wykorzystując wyniki pomiarów LDI MS i LDI MSI dla serii rozcieńczeń. Analizowano również surowice krwi wzbogaconą wzorcami kwasów w celu określenia wpływu matrycy na zawartość w/w kwasów. Podobnie jak w przypadku analizy aminokwasów roztwory kwasów karboksylowych zostały nałożone na stalowa płytka na którą napyłano zawiesiny nanocząstek Ag-109 generowanych laserowo. Dla wszystkich stosowanych kwasów karboksylowych wykonano analizy regresji danych uzyskanych z pomiarów LDI MS i MSI. Najlepsze dopasowanie wyników otrzymano z wykorzystaniem funkcji wielomianowej, gdzie najniższa wartość współczynnika korelacji R^2 wynosiła 0.96. Stwierdzono, że wykonane eksperymenty potwierdzają dużą przydatność MSI w analizie ilościowej kwasów karboksylowych. Uzyskane wyniki pomiarów LDI MS wzbogaconej kwasami karboksylowymi surowicy krwi wskazują, że matryca biologiczna ma umiarkowany wpływ na wartość sygnałów od nich pochodzących. W artykule VIII zbadano analitykę kwasów 3-hydroksykarboksylowych będących 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 1 mg/ml do 1 ng/ml. Ponadto otrzymane wyniki wykazały użyteczność nanocząstek Ag-109 w ilościowym oznaczaniu kwasów 3-hydroksykarboksylowych za pomocą MS w bardzo szerokim zakresie stężeń nawet do 1 ng/ml (np. dla kwasu 3-hydroksydodekanowego). Stwierdzono również, że w porównaniu do LDI MS w większości przypadków wyniki uzyskane za pomocą MSI charakteryzowały się lepszym dopasowaniem do linii trendu i dawały współczynnik korelacji równy 0.98 dla większości badanych kwasów. Analizowano również za pomocą MSI surowice krwi wzbogaconą kwasem 3-hydroksykarboksylowym w celu określenia wpływu matrycy biologicznej. Uzyskane wyniki wykazały znaczny wpływ matrycy zarówno na detekcję jak i oznaczanie zawartości kwasów: 3-hydroksydodekanowego, 3-hydroksyheksadekanowego i 3-hydroksyoktadekanowego. W artykule VII badano profilowanie metaboliczne surowicy krwi w raku pęcherza moczowego za pomocą LDI MS oraz ultra-wysokosprawnej chromatografii cieczowej połączonej z ultra-wysokorozdzielczą spektroskopią mas z jonizacją elektrosprejem (UHPLC-ESI-UHR MS + MS/MS). Badania miały na celu identyfikację związków występujących w surowicy krwi osób chorych na nowotwór pęcherza moczowego. Do analizy pobrano próbki surowicy krwi od pacjentów zarówno chorych na nowotwór pęcherza moczowego jak i zdrowych. Stwierdzono za pomocą LDI MS obecność 22 związków lipidowych wykazujących zdolność różnicowania próbek nowotworowych oraz kontrolnych. Na szczególne podkreślenie zasługuje wytypowanie



metabolitów pozwalających na rozróżnianie stadiów chorobowych. Profilowanie metaboliczne ekstraktów surowicy krwi wykonano na podstawie rezultatów badań otrzymanych z pomiarów niecelowych techniką ultra-wysokosprawnej chromatografii cieczowej połączonej z ultra-wysokorozdzielczą spektrometrią mas z jonizacją elektrosprejem. Artykuł VII kończący rozprawę doktorską poświęcony jest przeprowadzonym analizom statystycznym, które pozwoliły na wytypowanie zarówno związków różnicujących pacjentów chorych na nowotwór pęcherza moczowego od zdrowych jak również związków odróżniających stadia choroby.

Rozprawy mgr inż. Anety Płaza-Altamer należy ocenić pod kątem zawartych w niej rezultatów badań jako źródło eksperymentalnych danych, które wraz z przedstawioną wnikliwą interpretacją przyczynią się do dalszego rozwoju analityki związków małowcząsteczkowych oraz materiałów pochodzenia biologicznego ze szczególnym uwzględnieniem tkanek nowotworowych. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorantka w pełni opanowała szereg nowoczesnych technik instrumentalnych i uzyskała nowe wyniki istotne zarówno z poznawczego jak i aplikacyjnego punktu widzenia. Reasumując przedstawiona do oceny praca 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. 2018r. z dnia 30 sierpnia 2018r. art. 219).

Biorąc powyższe pod uwagę stawiam wniosek Radzie Dyscypliny Inżynieria Chemiczna Politechniki Rzeszowskiej o dopuszczenie Pani mgr inż. Anety Płaza-Altamer do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie w przekonaniu o wysokiej wartości merytorycznej rozprawy (opartej o 9 artykułów w czasopismach z listy filadelfijskiej o sumarycznym IF= 36.756) zawierającej istotne elementy nowości naukowej oraz aktywnym udziale w realizacji jednego projektu naukowo-badawczego wnioskuje o Jej wyróżnienie stosowną nagrodą.

Z. Hubicki

Lublin 26.06.2023

prof. dr hab. Zbigniew Hubicki



