



Politechnika Łódzka

Wydział Chemiczny

Instytut Chemii Ogólnej i Ekologicznej

prof. dr hab. inż. Małgorzata Iwona Szyrkowska-Jóźwik

RECENZJA

**o całokształcie dorobku naukowego, dydaktycznego,
organizacyjnego oraz rozprawie habilitacyjnej dr Joanny Nizioł
„Zastosowanie spektrometrii mas z miękką jonizacją w analizie
związków małowcząsteczkowych”**

Recenzja została opracowana na zlecenia Przewodniczącej Rady Dyscypliny Naukowej Inżynieria Chemiczna Politechniki Rzeszowskiej im. Ignacego Łukasiewicza nr RC/531/1/3_4 z dnia 21 grudnia 2021 r. w oparciu o decyzję Rady Doskonałości Naukowej (pismo Z2.4000.105.2021.6.IB z dnia 25 października 2021 r.).

Informacje ogólne

Pani dr Joanna Nizioł ukończyła studia magisterskie na specjalności Chemia biologiczna na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w 2008 roku. Pracę magisterską wykonała w Zakładzie Fizjologii i Biochemii Roślin na Wydziale Biochemii Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierownictwem prof. dr hab. Leszka Fiedora.

Rozprawę doktorską pt. „Borowe pochodne nukleozydów i nukleotydów” wykonała w Pracowni Chemii Bioorganicznej na Wydziale Chemicznym Politechniki Rzeszowskiej im. Ignacego Łukasiewicza pod opieką prof. dr hab. inż. Tomasza Rumana, uzyskując w 2015 r. stopień doktora nauk chemicznych w dyscyplinie technologia chemiczna. Praca doktorska uzyskała wyróżnienie Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Rzeszowskiej.

W 2009 roku Kandydatka odbyła staż absolwencki w Centrum Biotechnologicznym Katedry Biochemii i Biotechnologii Wydziału Chemicznego Politechniki Rzeszowskiej na stanowisku asystenta, w latach

2010-2015 zatrudniona była jako starszy referent techniczny w Centrum Biotechnologicznym Katedry Biochemii i Biotechnologii, a od września 2012 roku na tym samym stanowisku w Pracowni Chemii Bioorganicznej. W marcu 2015 roku awansowała na stanowisko starszego specjalisty naukowo-technicznego, a w 2016 roku asystenta.

Obecnie jest zatrudniona w Zakładzie Polimerów i Biopolimerów Wydziału Chemicznego Politechniki Rzeszowskiej im. Ignacego Łukasiewicza, pracując kolejno na stanowiskach asystenta (2016), adiunkta w okresie 2016-2020, a następnie profesora w grupie pracowników badawczo – dydaktycznych od grudnia 2020 r.

Przedmiotem recenzji jest przedstawiony przez Panią dr Joannę Nizioł monotematyczny zbiór 10 publikacji naukowych będących podstawą rozprawy habilitacyjnej, informacje o osiągnięciach dydaktycznych i organizacyjnych, współpracy naukowej oraz ocena całości dorobku naukowego.

Ocena pracy habilitacyjnej

Podstawą ubiegania się o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego jest osiągnięcie naukowe pod tytułem: **„Zastosowanie spektrometrii mas z miękką jonizacją w analizie związków małowcząsteczkowych”** przedstawione przez dr Joannę Nizioł jako monotematyczny cykl 10 publikacji naukowych opublikowanych w czasopiśmie indeksowanych na liście *Thomson Reuters JCR* w latach 2015-2021. Łączny współczynnik wpływu publikacji (JCR) wynosi $IF = 39,2$. Średnia wartość IF na jedną publikację (JCR) Habilitantki wynosi 3,92, a liczba punktów tych publikacji wg MEiN (poprzednio MNiSzW) wynosi 730 (150 pkt. wg punktacji obowiązującej w latach 2011-2018 oraz 580 wg punktacji obowiązującej od 2019 r.). Łączna suma cytowań (bez autocytowań) według bazy Web of Science (WoS) tych prac wynosi 86 (77).

Są to artykuły opublikowane w dobrych i bardzo dobrych czasopiśmie o IF od 1,982 do 6,986 tj: *Analytical Chemistry* [H1, H3], *Bioorganic & Medicinal Chemistry* [H2], *Phytochemistry* [H4, H5], *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [H6], *Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [H7], *Metabolomics* [H8], *International Journal of Mass Spectrometry* [H9], *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [H10].

W wyżej wymienionych publikacjach dr Joanna Nizioł jest 9 razy pierwszym i 6 razy korespondencyjnym autorem. Habilitantka udokumentowała swój udział w realizacji prac wieloautorskich w załączonych oświadczeniach Kandydatki i współautorów, pokazujące Jej istotną rolę w opracowanych koncepcjach prac naukowych oraz merytorycznej analizie podjętego zagadnienia. Należy tutaj docenić umiejętność wyważenia wkładu własnego, szczególnie, że badania były realizowane we współpracy z innymi grupami badawczymi.

Problem naukowy jaki przedstawiła dr Joanna Nizioł w autoreferacie i spójnym tematycznie cyklu 10 publikacji jest aktualny i wartościowy. Dotyczy opracowania nowych metod jonizacji w spektrometrii mas i nowych metod wytwarzania nanocząstek metalicznych ($^{109}\text{AgNPs}$ i AuNPs), zbadanie ich potencjału do oznaczania związków chemicznych i zastosowania do modyfikacji płytek w instrumentach MS. Badania Kandydatki polegały głównie na opracowaniu metody jakościowej i ilościowej analizy polarnych i niepolarnych związków małowcząsteczkowych w różnych rodzajach próbek z wykorzystaniem spektrometrii mas z miękką jonizacją, desorpcją/ionizacją laserową (LDI). Uzyskane wyniki analiz umożliwiły wytypowanie nowych biomarkerów nowotworu nerki, które mają potencjał we wczesnym rozpoznaniu choroby, wskazań dotyczących leczenia oraz jego monitorowania. Artykuły będące podstawą osiągnięcia naukowego zostały opublikowane w większości w bardzo dobrych czasopismach i poddane krytycznej ocenie recenzentów, w związku z czym ich dobry poziom merytoryczny został potwierdzony.

Pierwsze zagadnienie badawcze Pani dr Joanny Nizioł, opisane w publikacji [H1], związane było z opracowaniem nowej eksperymentalnej metody obrazowania za pomocą spektrometrii mas pod ciśnieniem atmosferycznym – LARESI (ablacja laserowa ze zdalną jonizacją przez elektrorozpylanie, ang. *laser ablation-remote-electrospray ionization*), pod kątem analizy rozkładu wybranych związków małowcząsteczkowych na różnych powierzchniach. Możliwości techniki LARESI przedstawiono na przykładzie analizy materiału biologicznego ludzkich tkanek nerki ze zdiagnozowanym nowotworem nerki, przeprowadzając celowane obrazowanie MS/MS w trybach SRM lub MRM. Do analizy wybrano aminokwasy, nukleozydy, zasady nukleinowe, witaminy oraz związki małowcząsteczkowe wskazywane w literaturze jako potencjalne biomarkery nowotworu nerki. Wyniki obrazowania przedstawiono dla wybranych związków, które wykazały zróżnicowanie pod względem zawartości w tkance nowotworowej i normalnej. Największe różnice stwierdzono dla związków takich jak seryna, kwas glutaminowy, histydyna i fentylalanina. Dla porównania, w celu wizualizacji rozkładu przestrzennego związków małowcząsteczkowych w badanej tkance nerki przeprowadzono również obrazowanie z wykorzystaniem metody $^{109}\text{AgNPET}$ LDI MS. W prawie każdym przypadku, otrzymane wyniki dla dwóch technik MSI były podobne i wyraźnie pokazały różnice między tkankami chorymi i zdrowymi. W publikacji, po raz pierwszy w literaturze, przedstawiono zastosowanie metody LARESI w MSI w przestrzennym rozmieszczeniu guaniny, urydyny, tyminy i inozyny w obrębie ludzkich tkanek nerki oraz w obrazowaniu materiału biologicznego w postaci ludzkich tkanek pod kątem wskazania potencjalnych biomarkerów nowotworu nerki.

Kolejny nurt badawczy Habilitantki dotyczył przydatności zastosowania metody AuNPET LDI MS w analizie związków małowymiarowych [H2-H4]. W publikacji [H2] stwierdzono, że borowa pochodna nukleozydów jest wbudowywana do kwasów nukleinowych jako funkcjonalna pochodna nukleotydu, co potwierdziła również analiza NMR. Brak sygnałów od tradycyjnych matryc organicznych w niskim rejonie m/z oraz zastosowanie wewnętrznej kalibracji z wykorzystaniem jonów złota, pozwoliło na identyfikację trzydziestu pięciu jonów pochodzących głównie od oligonukleotydów będących fragmentami zmodyfikowanej struktury DNA. W publikacji [H3] wykazano, że metoda AuNPET LDI MS umożliwiła analizę rozkładu przestrzennego związków małowymiarowych na powierzchni ludzkich tkanek nerki. Uzyskane wyniki wskazały na występowanie 32 związków, potencjalnych biomarkerów nowotworu nerki, które w największym stopniu pokazują różnice między obszarem tkanki nowotworowej i normalnej. Przykładem zastosowania metody AuNPET LDI MS w analizie tkanek roślinnych było obrazowanie MS przekroju poprzecznego łodygi rabarbaru (*Rheum rhabarbarum L.*) [H4]. W pracy przedstawiono 48 obrazów jonowych pokazujących przestrzenne rozmieszczenie wybranych metabolitów roślinnych w przekroju poprzecznym łodygi rabarbaru.

Kolejny obszar badań Kandydatki dotyczył zastosowania metody $^{109}\text{AgNPET}$ LDI MS w analizie związków małowymiarowych [H5-H8] w tkankach roślinnych na przykładzie owoców truskawki odmiany *Primoris* [H5] i tkankach ludzkich [H1, H6-H8]. Badany materiał stanowiły próbki surowicy [H6], moczu [H7] oraz tkanek [H1, H8] pobrane od grupy pacjentów z nowotworem nerki oraz grupy kontrolnej. Zastosowana metoda w połączeniu z wielowymiarową analizą statystyczną może być potencjalnym narzędziem w analizie metabolicznej ekstraktów surowicy moczu oraz tkanek pod kątem poszukiwania biomarkerów nowotworu nerki.

W publikacji [H9] przeprowadzono porównanie wydajności jonizacji związków testowych, jakimi były kwasy karboksylowe, z wykorzystaniem powierzchni modyfikowanych nanocząstkami złota oraz srebra monoizotopowego (AuNPET i $^{109}\text{AgNPs}$) z zastosowaniem techniki LDI MS. Wyniki pokazały, że kwasy tłuszczowe ulegały bardziej skutecznej jonizacji na płytce $^{109}\text{AgNPET}$ niż na AuNPET. Pozytywnym aspektem badań było wykazanie, że dwie opracowane metody mają niższą granicę wykrywalności niż stosowane powszechnie zestawy UPLC-MS oraz uzyskanie mniejszej wartości LOD dla kwasu palmitynowego w porównaniu z techniką MALDI MS na papierze czy MALDI-FTICR MS.

Publikacja [H10] przedstawia zastosowanie metody UPLC-HRMS w analizie związków małowymiarowych w ekstraktach moczu i tkanek o potencjalnym znaczeniu w

diagnostyce nowotworu nerki. Uzyskane wyniki pozwoliły na wytypowanie 28 związków, które w największym stopniu różnicowały obie badane grupy.

Na podstawie przeprowadzonych badań Habilitantka porównując w autoreferacie metodę UPLC-HRMS z opracowanymi metodami AuNPET i $^{109}\text{AgNPET}$ LDI MS podsumowała, że UPLC-HRMS okazała się bardziej czasochłonna, kosztowna i wymagająca specjalnego przygotowania próbek.

Głównymi osiągnięciami zawartymi w pracach oryginalnych, stanowiących o nowości naukowej tych badań i będących podstawą do nadania stopnia doktora habilitacyjnego, są w mojej opinii następujące elementy:

- wykazanie, że metoda LARESI MSI pozwala na analizę przestrzennego rozmieszczenia związków małowcząsteczkowych w bardzo złożonych matrycach;
- pokazanie, że obrazowanie MS metodą LARESI ma duży potencjał dla szybkich analiz tkanek nowotworowych oraz możliwości dalszych nowych zastosowań w różnych dziedzinach życia, m.in. badaniach medycznych, środowiskowych, żywności, farmacji;
- wykazanie, że metoda AuNPET LDI MS ma potencjał w identyfikacji zmodyfikowanych fragmentów struktury kwasów nukleinowych w ekstrakcie DNA wyizolowanym z komórek nowotworowych;
- wykazanie, że opracowane metody spektrometrii mas z laserową desoprpcją/ionizacją ($^{109}\text{AgNPET}$ i AuNPET) mogą być stosowane w analizie ilościowej i jakościowej związków małowcząsteczkowych w złożonych próbkach oraz analizie ich rozkładu przestrzennego w tkankach ludzkich i roślinnych.

Podsumowując tę część recenzji stwierdzam, że osiągnięcie habilitacyjne dr Joanny Nizioł stanowiące cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych, w których wykazano przydatność zastosowania nowych metod spektrometrii mas z laserową desoprpcją/ionizacją (AgNPET , $^{109}\text{AgNPET}$ i AuNPET) w analizie MS, MS/MS oraz MSI związków małowcząsteczkowych w różnych rodzajach próbek jest wartościowe, ma potencjał aplikacyjny oraz wnosi ważny wkład do wiedzy i literatury przedmiotu. Na podkreślenie zasługuje wysoka aktywność i szerokie zainteresowania naukowe Habilitantki, Jej duże doświadczenie w prowadzeniu badań doświadczalnych i rozwijaniu nowych technik, jak również umiejętność efektywnej współpracy w różnych zespołach.

Ocena pracy dydaktycznej i organizacyjnej

Dr Joanna Nizioł jest bardzo aktywnym nauczycielem akademickim, prowadzi laboratoria i wykłady dla studentów Wydziału Chemicznego na kierunku Biotechnologia na studiach I-go i II-go stopnia oraz dla studentów Wydział Budowy Maszyn i Lotnictwa na kierunku Mechanika i budowa maszyn na studiach II-go stopnia. Kandydatka przygotowała i była opiekunem oraz głównym prowadzącym dziesięć przedmiotów dydaktycznych, wykładów (W) i laboratoriów (L) takich jak: Chemia kosmetyków (W, L), Biochemia kryminalistyczna (W, L), Biochemia (L), Biokataliza (L), Toksykologia (L), Analiza Instrumentalna II (L), Izolacja i Identyfikacja Biomakromolekuł (L), Metabolomika i lipidomika (L), Technologie diagnostyczne i analityczne wspomagające inżynierię medyczną (L), Chemia i technologia biopaliw (L).

Na podkreślenie zasługuje również aktywność Habilitantki w opiece naukowej nad realizowanymi pracami dyplomowymi na Wydziale Chemicznym Politechniki Rzeszowskiej – 12 prac dyplomowych, w tym 8 inżynierskich oraz 4 magisterskie. W latach 2015-2021 wykonała 11 recenzji prac dyplomowych (5 inżynierskich i 6 magisterskich).

Działalność i aktywność naukowa Habilitantki była nagradzana m.in. w 2017 roku Nagrodą Rektora Politechniki Rzeszowskiej za osiągnięcia naukowe, a w 2016 roku Nagrodą Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego za osiągnięcia naukowe będące podstawą nadania stopnia doktora. W roku 2013 uzyskała Stypendium dla doktorantów w ramach projektu „Podkarpacki fundusz stypendialny dla doktorantów”, a w latach 2014 –2015 Stypendium doktorskie Politechniki Rzeszowskiej im. Ignacego Łukasiewicza.

Habilitantka jest aktywna i bierze czynny udział w działalności organizacyjnej prowadzonej na rzecz Uczelni. Była Członkiem Rady Wydziału Chemicznego i jest Członkiem Kolegium Wydziału Chemicznego (od 2021 r.) oraz Członkiem Rady Dyscypliny Inżynieria Chemiczna Wydziału Chemicznego Politechniki Rzeszowskiej im. Ignacego Łukasiewicza (od 2020 r.).

W roku 2018 brała udział w organizacji certyfikowanego szkolenia dla studentów pt. „Tworzenie receptur, produkcja i wprowadzanie kosmetyków do sprzedaży” oraz wizyty studyjnej pt. „Zapoznanie się z nowoczesnymi technologiami produkcji kosmetyków” w ramach programu POWER „Kuznia kluczowych kompetencji studentów Wydziału Chemicznego Politechniki Rzeszowskiej”.

Aktywnie uczestniczyła w promowaniu specjalności „Biochemia stosowana” dla studentów kierunku Biotechnologia. Od 2017 roku pełni funkcję Opiekuna specjalności „Biochemia stosowana” na kierunku Biotechnologia na studiach pierwszego stopnia. Od 2016 roku jest

Członkiem zespołu zadaniowego ds. oceny programów kształcenia i weryfikacji, powołanego przez Radę Wydziału Chemicznego Politechniki Rzeszowskiej.

Była również Członkiem komisji dokonującej oceny i współautorem raportu z oceny programu kształcenia i weryfikacji efektów kształcenia Politechniki Rzeszowskiej w latach akademickich 2016/2017 i 2017/2018 na Wydziale Chemicznym na kierunku Biotechnologia na studiach stacjonarnych I i II stopnia.

Kandydatka wygłosiła szereg wykładów popularnonaukowych: z okazji XXV Jubileuszowego Seminarium „Wybrane problemy chemii” na Politechnice Rzeszowskiej, pt. „(W)dzięki chemii, czyli związki chemiczne w kosmetykach” (20.02.2018); wykład na zaproszenie pt. “Chemistry and biochemistry of boron analogues and derivatives of nucleoside and nucleotides”, invited lecture (Erasmus+), UFOP, Ouro Preto, Brazylia (27.6.2017); wykład z okazji Dnia Otwartego Dla Dziewczyn na Politechnice Rzeszowskiej pt.: „Związki chemiczne w kosmetykach” (31.03.2017). Brała również udział w organizacji III Nocnego Spotkania z Nauką przedstawiając temat minilaboratorium „Jakie związki chemiczne znajdują się na naszym palcu” (02.10.2015).

Ocena całości dorobku naukowego

W dniu składania wniosku, całkowity dorobek naukowy dr Joanny Nizioł obejmuje 34 publikacje (30 w bazie *Journal Citation Reports* - JCR), 1 rozdział w monografii, 1 recenzowany materiał pokonferencyjny. Sumaryczny współczynnik wpływu wszystkich prac wg roku publikacji wynosił $IF = 97,798$, po habilitacji $IF=74,473$, 374 cytowań, 254 po habilitacji (310 bez autocytowań, 214 po habilitacji). Indeks Hirscha wynosił $H = 10$.

Na dzień 24.02.2022 r. dane (wg bazy *Scopus*) przedstawiają się następująco: 32 publikacje, 434 cytowań (353 bez autocytowań), Indeks Hirscha $H = 11$ ($H=10$ bez autocytowań).

Należy zauważyć, że aktywność naukowa i publikacyjna oraz dane scjentometryczne Habilitantki, szczególnie po uzyskaniu stopnia doktora, można uznać za dobre i wyraźnie można zaobserwować znaczne zwiększenie dorobku naukowego po doktoracie.

We wniosku nie znalazłam informacji o aktywności konferencyjnej Habilitantki, udziału w konferencjach krajowych i międzynarodowych (podany jest tylko 1 recenzowany materiał pokonferencyjny).

Chciałabym podkreślić bardzo aktywny udział dr Joanny Nizioł w realizacji 20 projektów (9 po doktoracie, 11 przed uzyskaniem stopnia doktora, 2 aktualnie realizowane). Obecnie realizowane przez Habilitantkę dwa projekty dotyczą: „Poszukiwania oraz charakterystyki

biomarkerów raka pęcherza" (kierownik, projekt Sonata 14, Narodowe Centrum Nauki, 2018/31/D/ST4/00109) oraz „Molekularnych aspektów ingerencji w mechanizm reakcji katalizowanej przez syntazę tymidylanową powoli wiążanego inhibitora N4-hydroksydCMP" (wykonawca, projekt Opus 12, Narodowe Centrum Nauki, 2016/21/B/NZ1/00288).

W latach 2016-2018 Habilitantka odbyła 3 staże w zagranicznych ośrodkach akademickich.

- The University of Oklahoma, Department of Microbiology and Plant Biology, USA, 3 miesiące, 2016 r.; Universidade Federal de Ouro Preto, Brazylia,

2 tygodnie, 2017 r.; The University of Montana, Center for Biofilm Engineering and Department of Chemical and Biological Engineering, USA, 18 dni, 2018 r. Pierwszy staż

związany był ze współpracą z prof. J. Sunner i prof. Iwoną Beech w zakresie obrazowania MS z wykorzystaniem metody LASCA oraz profilowania metabolomicznego materiału biologicznego, drugi w ramach współpracy z zespołem prof. Orlando Santosa oraz prof.

Katiane Nogueira, w ramach Programu Erasmus+ 36, natomiast 3. staż ponownie w ramach współpracy z zespołem prof. J. Sunnera oraz prof. Iwony Beech. Wszystkie pobyty w ośrodkach były stażami krótkoterminowymi, najdłuższy staż to 3-miesięczny pobyt.

Doceniam aktywność Kandydatki w tym zakresie, nie mniej jednak bardzo wartościowy byłby choć jeden wyjazd długoterminowy, którego zalety są trudne do przecenienia dla rozwoju młodego naukowca. W Polsce dr Joanna Nizioł współpracuje z Instytutem Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie z zespołem prof. Wojciecha Rode oraz z Politechniką Łódzką, z grupą prof. Beaty Gutarowskiej. Doceniając umiejętność współpracy Kandydatki z różnymi grupami badawczymi, mam pytanie dotyczące perspektywy utworzenia zespołu w macierzystej jednostce, czego oczekuje się od samodzielnego pracownika naukowego.

Z obowiązku recenzenta należy także odnotować, że szkoda, że nie udało się Habilitantce złożyć żadnego wniosku patentowego, który mocno podkreśliłby aspekt aplikacyjny i technologiczny badań Kandydatki i pokazał wartościową formę transferu wiedzy z naukowych centrów akademickich, tym bardziej, że rozpatrywana habilitacja jest w dziedzinie nauk inżynierijno-technicznych w dyscyplinie inżynieria chemiczna.

Podsumowując, uważam, że dr Joanna Nizioł spełnia warunki wymagane od samodzielnego pracownika nauki, gdyż posiada umiejętność opracowania koncepcji badań oraz rozwiązania problemu badawczego, włączania się w nurty współczesnych badań naukowych, uprawiania aktywnej działalności akademickiej, dydaktycznej oraz organizacyjnej. Prowadzi współpracę na poziomie międzynarodowym i krajowym oraz potrafi pozyskać projekty i środki finansowe na realizację badań naukowych. W

ocenianym okresie wykazała się aktywnością naukową, którą realizowała w więcej niż jednej uczelni, zarówno w kraju jak i za granicą. Kandydatka wykazała się samodzielnością naukową, a jednocześnie umiejętnością współpracy z innymi zespołami naukowymi.

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa habilitacyjna zatytułowana „**Zastosowanie spektrometrii mas z miękką jonizacją w analizie związków małowcząsteczkowych**”, jak również całokształt dorobku naukowego, dydaktycznego oraz innych osiągnięć Pani dr Joanny Nizioł spełnia wymagania formalne stawiane kandydatom do stopnia naukowego doktora habilitowanego zgodnie z art. 219 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. Ustaw RP z dnia 30 sierpnia 2018, poz. 1668 z późniejszymi zmianami).

Biorąc pod uwagę ww. kryteria, stwierdzam, że Pani dr Joanna Nizioł zasługuje na uzyskanie stopnia doktora habilitowanego i rekomenduję nadanie Pani dr Joannie Nizioł stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk inżynieryjno-technicznych w dyscyplinie inżynieria chemiczna.



prof. dr hab. inż. Małgorzata Iwona Szykowska-Jóźwik

Łódź, dn. 26 luty 2022 r.