

## RECENZJA HABILITACJI

### *Zastosowanie spektrometrii mas z miękką jonizacją w analizie związków małowcząsteczkowych*

Habilitantka (kandydatka do stopnia naukowego dr hab.): **dr inż. Joanna NIZIOŁ**

#### 1. ZAKRES I TEMATYKA DOROBKU NAUKOWEGO KANDYDATKI

Przedstawiony do oceny dorobek naukowy w ramach tematu habilitacyjnego dr Nizioł koncentruje się wokół zastosowań nowatorskiej techniki analitycznej spektrometrii mas.

Technologia chemiczna jest obecnie dyscypliną która w znacznej części nakłada się na inne dyscypliny w ramach dziedziny nauk inżynierjno-technicznych: inżynierią biomedyczną i inżynierią materiałową. Są to dyscypliny chemii stosowanej. Przedstawiony dorobek naukowy dr Nizioł mógłby być rozpatrywany we wszystkich trzech dyscyplinach. Tematyka dorobku jest skoncentrowana na analityce chemicznej na bardzo wysokim poziomie poznawczym i jednocześnie może mieć zastosowanie w diagnostyce medycznej, środowiskowej, oraz w analizie mieszanin chemicznych dowolnego pochodzenia. Chemicy stosują spektrometrię mas do identyfikacji związków chemicznych, otrzymanych na drodze syntezy, na równi z metodami spektroskopii jądrowego rezonansu magnetycznego. Spektrometria mas może służyć także do analizy ilościowej na poziomie attomolowym ( $10^{-18}$  mol/dm<sup>3</sup>) i dlatego ma zastosowanie w wielu dziedzinach. Zgromadzony i przedstawiony jako zbiór publikacji dorobek naukowy dr Nizioł koncentruje się wokół metod spektrometrii masowej o wysokiej czułości i dokładności wyznaczenia mas. Opracowane przez dr Nizioł techniki zostały zastosowane do badań obiektów biologicznych: tkanek oraz roślin.

Zastosowania te pozwolą przy dalszym udoskonaleniu na użycie opracowanych technik do medycznej analizy diagnostycznej oraz analizy środowiskowej.

## 2. AUTOREFERAT i HABILITACYJNY DOROBK NAUKOWY

Autoreferat jest opatrzony wstępem merytorycznym uzasadniającym wybór technik spektrometrii masowej, stosowanych do analizy związków o dużych masach cząsteczkowych, które zostały opracowane dla celów analizy polimerów syntetycznych oraz białek, kwasów nukleinowych i polocukrów. Ograniczeniem powszechnie stosowanej techniki MALDI, w których stosuje się matryce była niska użyteczność w wykryciu sygnałów o małych wartościach  $m/z$ , czyli analiza związków LMWC (low molecular weight compound). Stosowane techniki wymagały matryc powierzchniowych (SALDI) lub powiązania spektrometru z chromatografami LC lub innymi jak TLC lub SPE. Przełomowym odkryciem, w którym habilitantka uczestniczyła już w latach 2013-2015, było zastosowanie metalicznych nanocząstek: AgNPS, AuNPS i  $^{109}\text{AgNPS}$ . Te prace zostały wykonane w zespole kierowanym przez prof. Tomasza Rumana. W opracowaniu tych technik uczestniczyli doktoranci, którzy w następnych latach obronili swoje doktoraty z bardzo wysokim dorobkiem, około 10 publikacji. Prace badawcze i doskonalenie technik MS opartych na tej technice SALDI (surface assisted laser desorption ionization) były i są kontynuowane. Uczestniczy w nich dr Nizioł.

Szczegółowym zagadnieniem badawczym habilitantki było dostosowanie warunków pomiarowych do analizy ilościowej LMWC. W tym celu wykorzystane zostały wypracowane techniki Ag i Au NPET LDI MS oraz inne dla analizy materiałów biologicznych i obrazowania (MSI) próbek biologicznych. Wedle opisu zamieszczonego w Autoreferacie dr Nizioł opracowała i zastosowała jako metodę wzbudzania analitu LARESI (ablacja laserowa ze zdalną jonizacją przez elektrorozpylenie) i zastosowała ją do obrazowania spektrometrycznego w trybie

MS/MS do analizy próbek zmienionych nowotworowo tkanek pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem nerki w porównaniu z tkankami normalnymi [HI]. Celem analitycznym była analiza i poszukiwania małowcząsteczkowych markerów tych nowotworów. Analizowanymi potencjalnymi markerami były aminokwasy, tokoferol, zasady purynowe i nukleozyd urydyna. Istotnym osiągnięciem samej techniki wzbudzania była konstrukcja systemu pomiarowego LARESI SRM MSI, który pozwalał na operowanie materiałem badanym (tkanką) pod ciśnieniem atmosferycznym, w przeciwieństwie do innych technik MSI, które wymagają umieszczenia próbek w próżni, co dewastuje komórki tkanki badanej. Opracowana metoda otwiera możliwości dla analizy metabolomicznej, w tym także epigenetyki.

Wcześniejsze prace w grupie prof. Rumana były powiązane z pochodnymi borowymi nukleozydów i nukleotydów we współpracy z zespołem prof. Wojciecha Rode (Instytut Biologii Doświadczalnej im Nenckiego) w ramach wspólnego grantu MNiSzW. Zamysłem medycznym była próba wprowadzenia pochodnej borowej jako sposobu dostarczenia  $^{10}\text{B}$  jako targetu dla termicznych neutronów, czyli zastosowania borowej pochodnej nukleozydu do BNCT.

W 6 publikacjach z tego okresu dr Nizioł jest współautorem i publikacje te stanowiły dorobek doktorski habilitantki.

Badania były potem kontynuowane w zespole prof. Rumana [H2] a głównym autorem publikacji jest dr Nizioł. Publikacja [H2] jest spektakularna, ponieważ zsyntezowana uprzednio N(4)-dihydroksyboranowa pochodna 2'-deoksycytydyny ( $\text{dC}^{\text{BOH}}$ ) została wprowadzona do hodowli komórkowych nowotworowych (raka płasko-nabłonkowego, SCC-15) i normalnych (fibroblastach, BJ) jako donora borowego. Pochodna  $\text{dC}^{\text{BOH}}$  kierowała komórki nowotworowe selektywnie na szlak apoptotyczny. W sensie chemicznym ulega fosforylacji i wbudowuje się w oligodeoksynukleotydy; wykryto fragmenty di- i trinukleotydowe. Identyfikacja dii

trinukleotydy została dokonana metodami AuNPET LDI MS, HMRS i spektrometrią NMR, w szczególności eleganckim eksperymentem  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  HMBC.

Zastosowana metodyka analityczna MS może być użyta to podobnych badań z udziałem antynukleotydy, takich jak cytarabina, fludarabina i inne, których rola terapeutyczna polega na zatrzymaniu replikacji DNA, nikt jednak nie badał na poziomie molekularnym, co dzieje się z tymi antynukleotydami (antynukleozydami). Oczekiwałbym dalszego ciągu, czasu jest dużo.

Zastosowania metody AuNPET LDI w analizie MS, MS/MS i obrazowaniu MSI tkanek ludzkich były konsekwentnie realizowane w serii prac [H1], [H3], [H6-H8] i [H10]. W ramach współpracy z grupą urologów Ossolińskich z Kolbuszowej, którzy dostarczali materiałów biologicznych do badań, tj próbek tkanek nowotworów nerek oraz płynów fizjologicznych pacjentów, dr Nizioł przeprowadziła kompleksowe badania AuNPET LDI z detekcją MS. Wyniki opublikowano w sześciu artykułach. Była to wzorcowa współpraca interdyscyplinarna. Zaowocowała ona następującymi osiągnięciami:

[H3] analiza tkanek renal cell carcinoma (CCR) metodą AuNPET SALDI tkanek CCR pozwoliła na wykrycie markera nowotworowego - diglicerydu DG(18:1/20:0) oraz na wysokorozdzielcze zobrazowanie tkanek CCR i niezmiennych nowotworowo;

[H6] kompleksowa analiza metodami  $^{109}\text{Ag}$ NPET LDI MS oraz  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz instrument we współpracy z grupą z Montana State University) próbek surowicy pacjentów z nowotworami nerki (50 pacjentów vs 49 w kontroli) pozwoliła na zdefiniowanie 8 potencjalnych biomarkerów, LMWC w profilu biometabolicznym, spośród których 6 to tri- lub tetrapeptydy;

[H7] w metodycznie podobnej publikacji analizowano próbki moczu pacjentów z nowotworami nerki, a dla tych próbek inne markery były charakterystyczne niż markery otrzymane z próbek surowicy. Nowotworowe odmienne były poziomy 12

metabolitów. Ta analiza może być już używana w diagnostyce z powodu łatwej dostępności próbek do badań;

[H8] analiza metabolomiczna  $^1\text{H NMR}$   $^{109}\text{Ag NPET}$  LDI MS została wzbogacona o technikę ICP-OES w czterostronnej współpracy międzynarodowej. Tą techniką badano próbki ekstraktów z tkanek pacjentów CCR w celu określenia stężeń jonów metali (ICP). Analiza multiwariacyjna pozwoliła na identyfikację pięciu markerów CCR, powiązanie ich ze szlakami metabolomicznymi i dodatkowo powiązanie ich z różnymi jednostkami chorobowymi CCR;

[H10] szczególny typ nowotworu nerek, ccCCR był poddany analizie wodnych ekstraktów tkanek i moczu technikami LC-HMRS wspomagany statystycznie PLSDA. Wykryto serię 6 metabolitów obecnych zarówno w moczu jak i w ekstrakcie tkankowym.

Pozostałe publikacje przedstawione j ako dorobek habilitacyjny są tematycznie ściśle powiązane z metodami obrazowania z użyciem LDI MSI, w przypadku [1-14] zastosowano AuNPET do obrazowania rabarbaru a w przypadku [H5]  $^{109}\text{Ag NPET}$  do obrazowania owocu truskawki. W każdym przypadku wykryto cała serię charakterystycznych LMWC. W publikacji [H9] dokonano porównania metod wzbudzenia AuNPET i  $^{109}\text{Ag NPET}$  dla serii metabolicznie istotnych kwasów karboksylowych. Ta perspektywiczna praca metodyczna posłuży do doboru optymalnej techniki wzbudzania dla próbek biologicznych.

Przedstawiony do oceny dorobek habilitacyjny jest zwarty tematycznie, artykuły są opublikowane w najlepszych czasopismach analitycznych. Sumaryczny IF dla tych 10 publikacji jest bliski 40. Dorobek naukowy całkowicie spełnia wymagania habilitacji. Autoreferat omawiający ten dorobek jest odpowiednim przewodnikiem w trudnej dziedzinie technik spektrometrii mas.

### 3. WSPÓŁPRACA NAUKOWA KANDYDATKI

Dr Nizioł pracuje w Zespole badawczym, który współpracuje z pięcioma ośrodkami (laboratoriami) w: University of Oklahoma, Department of Microbiology and Plant Biology, Universidade Federal de Ouro Preto w Brazylii, University of Montana i ponadto z Instytutem Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie oraz Politechniką Łódzką. Wszystkie współprace mają charakter ciągły, a współpracownicy z tych ośrodków są także współautorami publikacji. W ramach współpracy dr Nizioł odbyła krótki staż i dwie wizyty robocze w latach 2016-2018. Późniejsze kontakty z tymi współpracownikami były ograniczone obowiązkami rodzinnymi, które dr Nizioł podjęła w ramach urlopów macierzyńskich i rodzicielskich w latach 2019-2020. Czas urlopowy nie zahamował jednak aktywności publikacyjnej dr Nizioł.

### 4. DOROBEK NAUKOWY SUMARYCZNY

Sumaryczny dorobek naukowy po doktoracie to 22 publikacje, z czego jako mono-tematyczny dorobek habilitacyjny Kandydatka przedstawiła 10 pozycji. Sumaryczny IF całego dorobku, włączając publikacje z doktoratu, jest bliski 100 punktów zgromadzonych w 34 publikacjach.

### 5. DZIAŁANOSĆ ORGANIZACYJNA i DYDAKTYCZNA

Dr Nizioł była Kierownikiem Grantu NCN Sonata 14 pt: Poszukiwanie oraz charakterystyka biomarkerów raka pęcherza, przyznanego w 2019 roku. Uczestniczyła jako wykonawca w wielu Grantach, w tym w dwóch projektach OPUS.

Dr Nizioł w ramach swoich obowiązków, wynikających z zatrudnienia na Wydziale Chemii Politechniki Rzeszowskiej, przygotowała i prowadziła zajęcia z przedmiotów wykorzystujących Jej wysokie kompetencje naukowe. Ponadto była ważnym członkiem gremiów wydziałowych, formułujących strategię rozwoju tego Wydziału. Aktywność dydaktyczna dr Nizioł doprowadziła w rezultacie do promocji magistrów wyspecjalizowanych w analizie MS i NMR oraz zainspirowała wielu spośród absolwentów do podjęcia pracy naukowo-badawczej.

Wyniki pracy naukowej, dydaktycznej i organizacyjnej zostały docenione przez nagrodzenie Jej dorobku naukowego Nagrodą Ministra i wielokrotnie nagrodami zespołowymi i indywidualnymi Rektora Politechniki Rzeszowskiej.

## 6. WNIOSEK KOŃCOWY

Dorobek naukowy Kandydatki jest bardzo dobry. Z 22 publikacji po doktoracie do habilitacji wykrojono tematycznie spójny zestaw 10 oryginalnych prac. Doświadczenie międzynarodowe Kandydatki jest wystarczające i opiera się na ścisłej współpracy z laboratoriami i ośrodkami, które wnoszą do współpracy istotny, lecz nie dominujący wkład, jak wynika z oświadczeń współautorów. Kandydatka wykazała się także umiejętnością planowania i administrowania projektami badawczymi, co jest trudne przed uzyskaniem pełnej samodzielności naukowej.

**Uważam, że zarówno dorobek naukowy, jak i umiejętność współpracy i kierowania projektami badawczymi całkowicie uzasadniają nadanie stopnia doktora habilitowanego w dyscyplinie inżynieria chemiczna, w ramach dziedziny nauk inżynieryjno-technicznych.**



Prof. dr hab. inż. Stanisław Wołowicz  
Kolegium Nauk Medycznych  
Uniwersytet Rzeszowski