



Gdańsk, 2019-12-09

Recenzja

rozprawy doktorskiej autorstwa mgr inż. JOANNY KRUSZEWSKIEJ zatytułowanej
*„Zastosowanie spektrometrii mas do badania wewnątrzkomórkowych przemian
metalnanomateriałów o potencjalnych właściwościach terapeutyczno-diagnostycznych”*

Oceniana praca doktorska mgr inż. Joanny Kruszewskiej dotyczy badania wewnątrzkomórkowych przemian wybranych metalnanomateriałów o potencjalnym zastosowaniu diagnostycznym i terapeutycznym poprzez zaproponowane i zoptymalizowane metodologie analityczne oparte na spektrometrii mas. Praca wykonana została pod kierunkiem promotora prof. dr. hab. Macieja Jarosza oraz promotora pomocniczego dr inż. Magdaleny Matczuk w Katedrze Chemii Analitycznej, Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej.

Wyniki badań Doktorantki dotyczące tematyki rozprawy opublikowane zostały w serii trzech artykułów, które ukazały się w latach 2018-2019 w renomowanych czasopismach analitycznych z listy *Journal Citation Reports* (JCR), a które wymienione zostały również na początku dysertacji. We wszystkich trzech pracach Doktorantka jest pierwszym autorem a sumaryczna wartość współczynnika wpływ tych prac wynosi ok. 9. W mojej ocenie dostatecznie to dokumentuje Jej wysokie zaangażowanie w realizację badań.

Jednocześnie, warto odnotować, że całkowity dorobek publikacyjny Doktorantki to w sumie 9 prac w czasopismach z listy JCR, które ukazały się od 2015 roku. Mgr Kruszewska ma także w swoim dorobku liczne wystąpienia ustne podczas konferencji krajowych (5) i międzynarodowych (14) oraz prezentacje plakatowe (w sumie 8). Była także wykonawcą w dwóch projektach finansowanych przez NCN oraz została wyróżniona za najlepszy plakat podczas międzynarodowej konferencji w 2016 roku i jest członkiem zespołu wyróżnionego naukową Nagrodą Rektora Politechniki Warszawskiej.

Rozprawa doktorska mgr inż. Joanny Kruszewskiej ma układ klasyczny i obejmuje ok. 85 stron przedstawiających cel pracy, w rozszerzonej wersji wprowadzenie oparte o informacja literaturowe, szczegółowy opis procedury badawczej z dogłębną analizą i dyskusją wyników oraz zwięzłe wnioski. Integralną częścią dysertacji są umieszczone na początku zestawienia skrótów użytych w pracy oraz streszczenia w języku polskim i angielskim.

W części literaturowej, opartej na 142 cytowanych pozycjach, Autorka dysertacji wprowadza czytelnika w zagadnienia podstawowe dotyczące chorób nowotworowych oraz stosowanych w ich diagnostyce i terapii nanomateriałów, ze szczególnym uwzględnieniem właściwości i zastosowań nanocząsteczek złota i kropek kwantowych. Omówione zostają także zagadnienia związane z metodologią analityczną stosowaną do badania przemian wewnątrzkomórkowych nanomateriałów, koncentrując się na aspektach pobierania i wewnątrzkomórkowej lokalizacji nanocząstek, ich charakteryzacji po pobraniu przez komórki oraz badań koron białkowych powstających na nanomateriałach w materiale biologicznym. Powyższe opracowanie jest wartościowe i stanowi właściwie zaproponowane wprowadzenie do opisu przeprowadzonych badań. W odniesieniu do tej części rozprawy w opinii recenzenta, celowe byłoby ustosunkowanie się do następujących kwestii:

- jak niezwiązana frakcja białka znajdująca się w badanym materiale biologicznym może wpływać na wynik oznaczeń ilościowych (str. 36),
- nie dość zręczne jest sformułowanie na str. 35 „jednym z najczęstszych sposobów podawania NPs w badaniach in vivo na zwierzętach jest ich wprowadzenie do krwioobiegu.” Nie jest jasne czy chodzi o iniekcję dożylną czy inną drogę podania, w wyniku której dochodzi do wchłonięcia nanocząstek do krążenia ogólnego. Nie jest to może uwaga o istotnym znaczeniu merytorycznym z punktu widzenia celu pracy, jednak powinność recenzenta, zwłaszcza wywodzącego się z nauk farmaceutycznych wymaga zwrócenia na powyższy aspekt uwagi.

Część doświadczalna pracy rozpoczyna się bardzo drobiazgową listą stosowanej aparatury, użytych odczynników a także spisem roztworów wykorzystywanych do przygotowania próbek i prowadzenia analiz oraz dokładnym opisem przygotowania próbek do badań. Bardzo obszerna jest część dotycząca uzyskanych wyników oraz ich dyskusji, gdzie szczegółowo, z użyciem licznych tabel (11 spośród 16 w całej pracy) i rycin (16 spośród 25 w całej pracy) przedstawione są kolejne istotne z punktu widzenia dysertacji etapy prowadzonych analiz.

Do wymiernych efektów prowadzonych badań Doktorantki opisanych w rozprawie należą:

- dość oczywista, ale jak najbardziej prawidłowa konstatacja, że spektrometria mas połączona z odpowiednimi technikami separacyjnymi jest skutecznym narzędziem do badań wewnątrzkomórkowych przemian różnych badanych w pracy metalonanomateriałów;

- także zgodne z dotychczasową wiedzą stwierdzenie, iż rozdzielczość sygnałów rejestrowanych za pomocą HPLC jest gorsza niż w przypadku techniki CE a odwrotnie jest jeśli chodzi o aspekty czułości metody;

- najcenniejszy z mojego punktu widzenia wniosek dotyczy możliwości zastosowania metod CE-ESI/MS-MS oraz μ HPLC-ESI-MS/MS w trybie „shotgun” do analizy proteomicznej białek oddziałujących z nanocząstkami w komórkach nowotworowych – stanowi to wyraźnie nowatorskie osiągnięcie szczególnie w kontekście użytych nanomateriałów i badanych linii komórkowych;

- co niezmiernie ważne, istotna jest również krytyczna uwaga, iż w przypadku obecności śladowych ilości białek w próbkach, niezbędna jest odpowiednia modyfikacja procedury przygotowania próbki polegająca na dodaniu etapu wzbogacania.

Analiza tej części pracy wymaga, aby poza wartościowymi i cennymi aspektami rozprawy, w której rozprawa doktorska mgr inż. Joanny Kruszewskiej jest bogata, zwrócić również uwagę na ewentualne pojawiające się niejasności czy prosić o komentarze dotyczące opracowania. Nie jest jednak łatwo znaleźć takie elementy w recenzowanej pracy. Między innymi dlatego, że część z wyników badań została już opublikowana w wysoce renomowanych czasopismach, których rygor wydawniczy zakłada rzetelne oceny od kilku zewnętrznych badaczy.

Na rycinie 25 elektroferogram uzyskany w wyniku analizy mieszaniny peptydów otrzymanych po trawieniu koron białkowych jest uboższy w liczbę sygnałów niż na analogicznym chromatogramie przedstawiającym wynik analizy przeprowadzony za pomocą metody μ HPLC-ESI-MS/MS. Jednocześnie w tabeli 16 przedstawiono listę zidentyfikowanych peptydów w wyniku obu wyżej wymienionych analiz. W tym przypadku liczba peptydów zidentyfikowanych za pomocą metody CE-ESI/MS-MS jest większa niż w przypadku drugiej metody. Z czego wynika obserwowana różnica i czym można ją tłumaczyć? Analizując próbki z użyciem techniki elektroforetycznej w celu ograniczenia adsorpcji peptydów na powierzchni wewnętrznej ścian kapilary stosowano dodatki do buforu takie jak DMF i polibren. Czym kierowano się przy wyborze tych dwóch dodatków i czemu nie podjęto próby zastosowania kapilar o ścianach wewnętrznych modyfikowanych chemicznie warstwą monomeru? Na stronie 77 Autorka odnosi się do wyników przeprowadzonych analiz elektroforetycznych i wskazuje na brak znaczących różnic w rozdzielczości związanych ze zmianą długości kapilary z 70 cm na 110 cm. Jest to interesująca obserwacja, która w świetle znanych zasad rozdzielania

elektroforetycznego wymaga dodatkowego omówienia. Stwierdzenie na str. 63, że „użycie buforu pracującego o wyższym pH powoduje zwiększoną dysocjację grup silanolowych, co może prowadzić do zmniejszenia adsorpcji rozdzielanych składników w wyniku zwiększonego odpychania elektrostatycznego” będzie prawdziwe jedynie w przypadku, gdy sumaryczny ładunek korony białkowej na powierzchni nanocząstek będzie ujemny. Czy Autorka może dodatkowo skomentować ten aspekt wyników? W dysertacji są nieliczne błędy językowe jak np. na str. 68 „białka serum”, jednak ich wpływ na ogólną ocenę pracy jest marginalny.

Powyższe uwagi i pytania nie wpływają na wartość merytoryczną pracy, którą oceniam bardzo wysoko zarówno w zakresie części literaturowej, która stanowi świetny materiał poglądowy jak i w odniesieniu do części doświadczalnej. Wybrana i stosowana metodologia badań nie budzi zastrzeżeń. Zaproponowane postępowania są oryginalne i stanowią nowatorski wkład do świata nauki. Praca doktorska Pani mgr inż. Joanny Kruszewskiej ma istotne walory oryginalności naukowej. Przygotowanie Doktorantki w zakresie chemii analitycznej, analizy proteomicznej oraz nanotechnologii, jak również umiejętne ocena uzyskanych wyników i wyważona ich interpretacja budzi uznanie i jest wyróżniająca na tle innych prac doktorskich. Dodatkowo mając na uwadze publikacje o wysokich współczynnikach wpływu stanowiących podstawę opracowania rozprawy doktorskiej, jak również wiodącą, pierwszoautorską, rolę w ich powstawaniu oraz sześć innych publikacji z listy JCR, które są w dorobku p. Kruszewskiej wnoszę o wyróżnienie pracy doktorskiej.

Biorąc powyższe pod uwagę oraz fakt spełnienia wymagań ustawowych wnioskuję do Wysokiej Rady Dyscypliny Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie mgr inż. Joanny Kruszewskiej do publicznej obrony tez pracy przedstawionych w dysertacji.

KIEROWNIK ZAKŁADU
Biofarmacji i Farmakokinetyki
prof. dr hab. Michał J. Markuszewski