

Kraków, 8 maja 2024 roku

Prof. dr hab. Grzegorz Zadora
Instytut Ekspertyz Sądowych im. Prof. dra Jana Sehna
ul. Westerplatte 9
31-033 Kraków
E-mail: gzadora@ies.gov.pl

Zespół Chemii Sądowej
Instytut Chemii
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych
Uniwersytet Śląski w Katowicach
ul. Szkolna 9
40-006 Katowice
E-mail: grzegorz.zadora@us.edu.pl

Recenzja pracy doktorskiej autorstwa Pani mgr inż. Klaudii Głowacz

*pt. Fluorescencja multispektralna i metody chemometryczne
w zastosowaniach (bio)analitycznych*

wykonanej w Katedrze Biotechnologii Medycznej na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Patrycji Ciosek-Skibińskiej. Praca została wykonana w ramach projektu Sonata Bis UMO-2018/30/E/ST4/00481 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki oraz w ramach projektu BIOTECHMED-1 nr 504/04496/1020/45.010401 finansowanego ze środków Politechniki Warszawskiej uzyskanych w ramach programu „Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza” (IDUB-PW).

W recenzowanej pracy opisano badania, których celem było opracowanie metod (bio)analitycznych wykorzystujących fluorescencję multispektralną i metody chemometryczne do analizy próbek biologicznych (hodowli komórkowych), a także detekcji (bio)analitów wykazujących duże podobieństwo strukturalne (neuroprzekazniki, fragmenty peptydowe amyloidu β), w tym testowano:

- a) możliwości zastosowania fluorescencji multispektralnej i metod chemometrycznych do badania zmian żywotności komórek w hodowli *in vitro*, wywołanych przez wybrane czynniki stresogenne,
- b) możliwości zastosowania fluorescencji multispektralnej kropek kwantowych, która ulegała zmianie wynikającej z oddziaływań z różnymi (bio)analitami, do ich analizy jakościowej i/lub ilościowej,
- c) wydajności wybranych sposobów przetwarzania danych i metod chemometrycznych w analizie jakościowej i/lub ilościowej modelowych (bio)analitów.

Recenzowana rozprawa doktorska składa się z sześciu publikacji naukowych, w tym pięciu opublikowanych oraz obszernego komentarza teoretycznego do opublikowanych

artykułów. Całe opracowanie liczy łącznie 223 strony. Część właściwą pracy poprzedzają wykaz skrótów, lista artykułów naukowych będących podstawą rozprawy doktorskiej oraz streszczenia w języku polskim i angielskim.

W rozdziale pierwszym pt. *Wprowadzenie – przegląd literatury* (15 stron) opisano obecny stan wiedzy dotyczący metod (bio)analitycznych wykorzystujących spektralne „odciski palca”, w tym systemy multireceptorowe oraz multisensorowe. Ponadto opisano zastosowania (bio)analityczne fluorescencji multispektralnej oraz modele chemometryczne stosowane w interpretacji m.in. widm wzbudzenia-emisji, które rejestrowane są podczas pomiarów fluorescencji multispektralnej.

W jednostronicowym rozdziale drugim przedstawiono cel i zakres pracy doktorskiej.

Rozdział trzeci recenzowanej pracy (13 stron) to komentarz do cyklu artykułów naukowych będących podstawą rozprawy doktorskiej, a po nim w czterostronicowym rozdziale czwartym, doktorantka podsumowuje wyniki swoich badań oraz wymienia najważniejsze osiągnięcia badawcze uzyskane w ramach realizacji rozprawy doktorskiej.

W rozdziale piątym zatytułowanym *Bibliografia* (rozdział bez numeru) umieszczono piśmiennictwo (108 pozycji), na które powołuje się w swojej pracy doktorantka.

W następnych rozdziałach zamieszczono oświadczenia współautorów publikacji oraz kopie sześciu publikacji omawianych w rozprawie doktorskiej (w tym 5 wchodzących w skład cyklu). Na samym końcu rozprawy znajduje się opis całego dorobku naukowego Pani Głowacz.

Prace będące podstawą rozprawy doktorskiej opublikowano (lub wysłano do publikacji) w renomowanych czasopismach posiadających tzw. współczynnik wpływu (*impact factor*; IF) - *RSC Advances* (1 publikacja), *ACS Omega* (1 publikacja), *Microchimica Acta* (dwie publikacje), *Sensors and Actuators B: Chemical* (1 publikacja) oraz *Analytica Chimica Acta* (1 publikacja wysłana do recenzji). Łączny IF pięciu opublikowanych prac wchodzących w skład cyklu to 27,8 a suma punktów MNiSW to 590. We wszystkich tych publikacjach Pani Głowacz jest pierwszym autorem, a w dwóch z nich również autorem korespondencyjnym. Wkład doktorantki poparty oświadczeniami współautorów, można ocenić za wiodący i co za tym idzie, recenzowaną rozprawę można uznać za wyraźnie wyodrębnioną część pracy zbiorowej.

Na uwagę zasługuje fakt, że część badań wykonano we współpracy międzynarodowej, tj. z grupą Profesora Rasmusa Bro, który jest cenionym w środowisku naukowcem specjalizującym się w zastosowaniu metod uczenia maszynowego i sztucznej inteligencji w chemii analitycznej (Department of Food Science, University of Copenhagen, Denmark). Doktorantka przebywała na wizycie studyjnej w grupie Profesora Bro w ramach projektu badawczego BIOTECHMED-1 nr 504/04496/1020/45.010401 (finansowanego ze środków Politechniki Warszawskiej).

Wyniki badań przeprowadzonych przez doktorantkę pozwoliły m.in:

- a) zaproponować metodę (bio)analityczną służącą do określania żywotności komórkowej w hodowli *in vitro* poddanej działaniu czynników stresogennych (promieniowanie UV, oksaliplatyna), w której stosuje się fluorescencję multispektralną oraz metody chemometryczne do interpretacji widm. Na uwagę zasługuje fakt, że metoda ta jest bezinwazyjna i nie wymagająca użycia znaczników oraz, że pozwala na określenie żywotności komórkowej danej populacji komórek w czasie rzeczywistym,
- b) wykazać, że fluorescencja multispektralna neuroprzekaźników czy peptydów z rodziny A β (podobnych strukturalnie) pozwala na uchwycenie subtelnych różnic w ich wpływie na właściwości fluorescencyjne kropek kwantowych pokrytych glutationem – czego nie można zaobserwować podczas rejestracji klasycznych widm fluorescencyjnych. Ponadto wykazano, że przetworzenie uzyskanej informacji za pomocą metod chemometrycznych umożliwia analizę jakościową i ilościową,
- c) zaproponować metodę detekcji (w tym na poziomie nanomolowym, oraz w mieszaninach) krótkich form peptydów z rodziny A β związanych z chorobą Alzheimer, w której stosuje się kropki kwantowe pokryte kwasem tiomalowym i fluorescencję multispektralną a interpretacje widm wzbudzenia-emisji wykonuje z wykorzystaniem analizy dyskryminacyjnej za pomocą metody częściowych najmniejszych kwadratów (PLS-DA).

Z zamieszczonego na końcu rozprawy doktorskiej dorobku naukowego Pani mgr inż. Klaudii Głowacz wynika, że bardzo aktywnie publikowała wyniki swoich badań. Jest współautorem 10 publikacji (dwie opublikowane w materiałach recenzowanych a jedna w recenzji), w tym w ośmiu jest pierwszym autorem. Jest to bardzo dobry wynik. Brała udział w trzech projektach badawczych finansowanych bądź przez Narodowe Centrum Nauki (dwa projekty) bądź przez Politechnikę Warszawską (jeden projekt). Na uwagę zasługuje fakt, że samodzielnie prezentuje wyniki badań grupy badawczej, której jest członkiem, zarówno na konferencjach krajowych (siedem wystąpień), jak i zagranicznych (cztery wystąpienia). Rozwijała również swoje umiejętności badawcze biorąc udział w czterech cyklach szkoleniowych Międzynarodowej Szkoły Chemometrii oraz podczas wizyty studyjnej w grupie Prof. Rasmusa Bro, co jak już wspomniałem zaowocowało współpracą naukową zakończoną publikacją w czasopiśmie *ACS Omega*. Na wyróżnienie zasługuje również działalność dydaktyczna doktorantki, która była opiekunką aż ośmiu prac inżynierskich i magisterskich. Badania naukowe grupy badawczej, w której skład wchodziła mgr inż. Klaudia Głowacz zostały docenione nagrodą *Rektorską Zespołową I Stopnia za osiągnięcia naukowe w latach 2021-2022*.

Komentarzem do opublikowanych artykułów została napisany starannie w języku polskim. Mam jednak dwie uwagi edytorskie do tej części rozprawy doktorskiej:

- a) Tabela 5 powinna mieć linie oznaczające kolumny/wiersze lub być nazwana rysunkiem;

b) brak jest, wliczając w to rozdział „Wykaz skrótów stosowanych pracy”, informacji co oznacza skrót MTT (test MTT).

Z nałożonego na mnie obowiązku recenzenta, poniżej sformułowałem również kilka uwag krytycznych oraz zagadnień, prosząc zarazem doktorantkę o ustosunkowanie się do nich w trakcie publicznej obrony pracy doktorskiej:

1) na stronie 30 komentarza do opublikowanych artykułów doktorantka napisała, że „Zastosowanie metod modelowania bez nadzoru może również pozwolić na wykrycie obiektów znacznie się różniących, które nie są reprezentatywne dla analizowanego zbioru danych i nie powinny być rozpatrywane w dalszych etapach modelowania [102].” Jak podejmowała doktorantka decyzje o tym czy dany wynik to tzw. wyniki odstający i należy go usunąć ze zbioru danych? Czy zawsze tzw. wynik odstający należy usunąć ze zbioru danych?


2) Jaka jest różnica w chemometrii między metodami dyskryminacyjnymi a metodami klasyfikacyjnymi (metody modelowania indywidualnych grup)?

3) Jak wybierano próbki do zbiorów uczących i testowych?

4) na stronie 45 komentarza do opublikowanych artykułów doktorantka napisała, że „Hierarchiczna analiza skupień (HCA, ang. hierarchical cluster analysis) dodatkowo potwierdziła czułość metody w zakresie mikromolowym (Rysunek S3B w suplemencie publikacji P4).” Proszę o wyjaśnienie, w jaki sposób interpretowano dendrogram aby potwierdzić „czułość metody”. Czy informacja uzyskana z zastosowania analizy czynników głównych (PCA) nie byłaby wystarczająca?

4) na stronach 51 i 52 do opublikowanych artykułów doktorantka napisała, że „W trakcie badań dokonano oceny wpływu trzech metod wstępnego przetwarzania danych (autoskalowanie, dyskretna transformata falkowa, normalizacja przez transformację SNV) i efektywności trzech metod chemometrycznych (PLS-DA, SVM-DA, SIMCA) w modelowym zadaniu klasyfikacji aminokwasów i oligopeptydów.” Proszę o wyjaśnienie jak wykonano wybory tych a nie innych „metod wstępnego przetwarzania danych oraz „metod chemometrycznych”.

Podsumowując, praca doktorska mgr inż. Klaudii Głowacz spełnia wymogi stawiane tego typu pracom zgodnie z Ustawą z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późn, zm.). Wnioskuje zatem do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie Pani mgr inż. Klaudii Głowacz do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz wyróżnienie niniejszej pracy doktorskiej (szczegółowe uzasadnienie znajduje się w odrębnym wniosku).

PROFESOR

prof. dr hab. Grzegorz Zadora