

Warszawa 6 maja 2024

Recenzja Rozprawy Doktorskiej magister inżynier Klaudii Głowacz
pt: „Fluorescencja multispektralna i metody chemometryczne
w zastosowaniach (bio)analitycznych”

Rozprawa doktorska magister inżynier Klaudii Głowacz zatytułowana „Fluorescencja multispektralna i metody chemometryczne w zastosowaniach (bio)analitycznych” wykonana została w Katedrze Biotechnologii Medycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Patrycji Ciosek-Skibińskiej. Podjęta w rozprawie tematyka wpisuje się w aktualny nurt badawczy poszukiwania nowych rozwiązań pozwalających na analizę próbek wieloskładnikowych w matrycach złożonych bez konieczności izolacji poszczególnych składników. W takim podejściu wykorzystuje się jednocześnie, na ogół nieselektywne rozpoznawanie wielu składników próbki, co prowadzi do uzyskania unikalnych zestawów sygnałów analitycznych badanych próbek o skomplikowanym składzie. Analiza numeryczna i statystyczna tych wielowymiarowych danych pomiarowych pozwala na otrzymanie niezbędnych informacji do jakościowej, a czasem także ilościowej analizy składu badanej próbki wieloskładnikowej. Trudność tego podejścia stanowi czasochłonna i wieloetapowa analiza chemometryczna polegająca na wstępnym przygotowaniu danych poprzez ich porządkowanie, eliminowanie artefaktów i dobranie odpowiedniej metody modelowania danych oraz uczenia maszynowego. Stanowi to alternatywę dla klasycznych technik instrumentalnych przeznaczonych zazwyczaj do selektywnego oznaczania wybranych analitów po ówczesnym, często wieloetapowym, procesie przygotowania badanej próbki.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska to seria sześciu powiązanych tematycznie publikacji, w których mgr inż. Klaudia Głowacz jest pierwszym autorem, ponad to w dwóch jest również autorem korespondencyjnym. Wskazuje to na jej znaczący wkład w prowadzonych badaniach, co również wynika z załączonych oświadczeń. Zgodnie z art. 187 ustęp 3 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023 poz. 742 z późn. Zm.) rozprawę

doktorską może stanowić zbiór opublikowanych artykułów naukowych, dlatego zamieszczony manuskrypt P6, będący w trakcie recenzji nie został uwzględniony w niniejszej recenzji. Pozostałe pięć publikacji ukazało się w uznanych czasopismach z zakresu badań multidyscyplinarnych, tj. RSC Advances i ACS Omega oraz chemii analitycznej, tj. Microchimica Acta i Sensors and Actuators B. O randze prowadzonych badań świadczą cytowania tych prac przez niezależne zespoły badawcze. Seria prac poprzedzona jest krótkim, ale wyczerpującym przeglądem literaturowym (Rozdział 1), który wprowadza czytelnika w zagadnienia stanowiące podstawę prowadzonych w ramach rozprawy badań naukowych oraz aktualny stan wiedzy w tym zakresie. Z lektury tej dowiadujemy się o metodach (bio)analitycznych opartych o spektroskopowe i elektrochemiczne zestawy sygnałów analitycznych badanych próbek do oznaczania analitów w próbkach wieloskładnikowych. Szczególną uwagę Doktorantka poświęciła spektroskopii fluorescencyjnej macierzy wzbudzenia-emisji i jej zastosowaniu w (bio)analizie, w tym do monitorowania procesów biotechnologicznych, rozróżniania bakterii, czy do diagnostyki medycznej. Następnie metodologicznie opisała proces postępowania z zestawem danych sygnałów analitycznych badanych próbek wieloskładnikowych, w tym zaawansowanych narzędzi numerycznych do modelowania danych bez i z nadzorem oraz oceny jakości modeli predykcyjnych. Należy podkreślić, że wstęp jest bardzo czytelnie napisany. Za bardzo wartościowe uważam umieszczenie w nim tabel, które ułatwiają śledzenie dotychczasowych osiągnięć naukowców w zakresie wykorzystania analiz zestawów sygnałów analitycznych do wykrywania i oznaczania wybranych analitów oraz graficznego przedstawienia metod numerycznych stosowanych przez Doktorantkę do analizy wyników własnych.

W Rozdziale 2 Doktorantka w jasny i klarowny sposób sformułowała cel badań, który polegał na opracowaniu metod analitycznych wykorzystujących spektroskopię fluorescencyjną macierzy wzbudzenia-emisji wraz z wybranymi metodami numerycznymi do analizy zestawów sygnałów analitycznych badanych próbek wieloskładnikowych. W ramach prowadzonych prac podjęła się badań nad: (i) monitorowaniem zmian żywotności komórek w hodowli *in vivo* poddanych wybranym czynnikom stresogennym; (ii) rozróżnianiem i wykrywaniem analitów o dużym podobieństwie strukturalnym badanych cząsteczek; (iii) wyboru metody chemometrycznej i optymalizacji numerycznego przetwarzania zestawów sygnałów analitycznych.

Rozdział 3 to komentarz do serii artykułów, zaś Rozdział 4 zawiera zwięzłe podsumowanie prowadzonych przez Doktorantkę badań wraz z wypunktowanymi ośmioma osiągnięciami.

Wchodzące w skład rozprawy publikacje zostały już poddane ewaluacji i ocenie zarówno recenzentów, jak i edytorów podczas procesu publikacyjnego, dlatego pozwolę sobie je tylko krótko przedstawić i skomentować.

W publikacji P1 zatytułowanej „Excitation-emission matrix fluorescence spectroscopy for cell viability testing in UV-treated cell culture” (K Głowacz, S. Skorupska, I. Grabowska-Jadach, P. Ciosek-Skibińska, RSC Advances 2022, 12, 7652) Doktorantka zaproponowała wykorzystanie endogennej fluorescencji składników komórek do określenia ich żywotności w hodowli *in vivo* po poddaniu ich działaniu czynnika stresogennego, jakim w tym przypadku był wpływ promieniowania z zakresu UV. W tym celu opracowała metodę pomiarową z wykorzystaniem 96-dokłkowej płytki pomiarowej i akwizycją fluorescencji macierzy wzbudzenia-emisji. Wyniki zweryfikowała względem standardowej metody – testu MTT umożliwiającego pomiar aktywności enzymów mitochondrialnych w komórce. Analiza złożonych widm fluorescencji macierzy wzbudzenia-emisji pozwoliła na określenie żywotności komórek, a zgodność z testem MTT pozwala mieć nadzieję, że może to być alternatywa, nieinwazyjna metoda pomiarowa do pomiarów w czasie rzeczywistym. Doktorantka jest świadoma, że zastosowany przez nią model analizy numerycznej może być ograniczony tylko do badanego układu. Wykazała też, jak istotna jest kontrola próby referencyjnej w macierzach złożonych, ze względu na zmiany samego tła. Krytyczne podejście do wyników własnych świadczy o dojrzałości naukowej na tym etapie kariery.

W kolejnym kroku w pracy P2 zatytułowanej „Excitation–Emission Matrix Fluorescence Spectroscopy Coupled with PARAFAC Modeling for Viability Prediction of Cells” (K. Głowacz, S. Skorupska, I. Grabowska-Jadach, R. Bro, P. Ciosek-Skibińska, ACS Omega 2023, 8, 15968) poszerzyła swoje badania poświęcone żywotności komórek poddając je działaniu chemicznego czynnika stresogennego, w tym przypadku oksaliplatyny – leku o działaniu przeciwnowotworowemu. Także i w tym badanym układzie wykazano, że można wykorzystać natywną fluorescencję komórek do badań ich żywotności poprzez dobranie odpowiedniego modelu matematycznego z dogłębną analizą statystyczną. Wartością dodaną wynikającą z tych badań było uzyskanie lepszej czułości proponowanej metody w porównaniu do informacji uzyskiwanych dla standardowego testu MTT. Dobranie odpowiedniego modelu analizy danych

pozwoLIŁO rÓwnieŻ na śledzenie zmian stężenia fluoroforów w poŻywce, które wpŁywają bezpośrednio na zmiany żywotności komÓrek.

Do badania analitów o zbliżonym podobieństwie strukturalnym Doktorantka zaproponowała użycie nanokryształów półprzewodnikowych. W pracy P3 zatytułowanej „Excitation-emission fluorescence matrix acquired from glutathione capped CdSeS/ZnS quantum dots in combination with chemometric tools for pattern-based sensing of neurotransmitters” (K. Głowacz, M. Drozd, P. Ciosek-Skibińska, *Microchimica Acta* 2021, 188: 343) do rozróżniania neuroprzeKaźników wybrano otoczkowane kropki kwantowe, które następnie zmodyfikowano glutationem. W odróżnieniu do opublikowanych dotąd prac do rozpoznawania analitów wykorzystano tylko jeden rodzaj modyfikowanych kropek kwantowych i chemometryczną analizę zestawu fluorescencyjnych widm wzbudzenia-emisji. To nowatorskie rozwiązanie pozwoliło Doktorantce na rozróżnianie wybranej grupy neuroprzeKaźników oraz na ilościowe oznaczenie katecholaminowych neuroprzeKaźników na poziomie mikromolarnym.

W kolejnych badaniach opisanych w pracy P4 zatytułowanej „Quantum dots-based “chemical tongue” for the discrimination of short-length Aβ peptides” (K. Głowacz, M. Drozd, W. Tokarska, N.E. Wezynfeld, P. Ciosek-Skibińska, *Microchimica Acta* 2024, 191:95) Doktoratka wykorzystowała strategię z pracy P3 i przy użyciu jednego typu kropek kwantowych modyfikowanych kwasem tiojabłkowym podjęła próbę rozpoznania i rozróżnienia krótkich peptydów z rodziny Aβ powszechnie uważanych za powodowanie choroby neurodegeneracyjnej do jakiej zaliczany jest Alzheimer. Analiza zestawu fluorescencyjnych widm wzbudzenia-emisji kropek kwantowych oddziałujących z krótkimi peptydami Aβ z wykorzystaniem odpowiednich narzędzi numerycznych udowodniła, że jest możliwość rozróżniania bardzo podobnych strukturalnie do siebie analitów w próbkach wieloskładnikowych. Dodatkowo, istnieje możliwość ilościowego oznaczenia krótkich peptydów Aβ na poziomie 10^{-9} M. Pozwala to mieć nadzieję, że metoda ma potencjał być wykorzystana do wykrywania biomarkerów chorób neurodegeneracyjnych.

Praca P5 zatytułowana „Comparison of various data analysis techniques applied for the classification of oligopeptides and amino acids by voltametric electronic tongue” (K. Głowacz, U.E. Wawrzyniak, P. Ciosek-Skibinska *Sensors and Actuators B* 2021, 331, 129354) poświęcona jest dogłębnej analizie zastosowanych metod numerycznych do przetwarzania złożonych danych

pomiarowych, w tym przypadku zestawów krzywych woltamperometrycznych użytych do wykrywania aminokwasów i oligopeptydów, do jakościowego i ilościowego oznaczania analitów w próbkach złożonych.

W trakcie lektury niniejszego doktoratu znalazłam kilka kwestii do dyskusji:

Czy kropki kwantowe modyfikowane glutationem lub kwasem tiojabłkowym powinny być nazywane (nano)receptorem czy raczej elementem rozpoznającym?

W pracy P3 i P4 Doktorantka stwierdza, że obserwuje wzmocnienie fluorescencji w przypadku oddziaływania kropek kwantowych z neuroprzekaźnikami GABA i acetylocholiną (praca P3 rysunek 2 f i g) i peptydem A β ₅₋₉ (praca P4 rysunek 1 b i e) na podstawie zarejestrowanych natężeń fluorescencji. Proszę o komentarz i uzasadnienie dlaczego tak małe różnice w natężeniu fluorescencji w pracy P4 zostały zinterpretowane jako wzmocnienie sygnału. Czy ta różnica w natężeniu jest statystycznie istotna? Ponadto w obu pracach nie znalazłam informacji o badaniu stabilności w czasie zmodyfikowanych kropek kwantowych. Czy ulegają one fotodegradacji podczas serii pomiarów? Czy wzrost natężenia fluorescencji mógł być związany jedynie ze stężeniem kropek kwantowych?

Zastosowanie tylko jednego rodzaju zmodyfikowanych kropek kwantowych do ilościowego oznaczania neuroprzekaźników pozwoliło na wykrycie na poziomie 10⁻⁶ M. Czy to odpowiedni poziom, aby myśleć o zastosowaniu tego typu analiz w diagnostyce medycznej? Czy jest możliwość obniżenia limitu detekcji oznaczeń przy wykorzystaniu analizy zestawu fluorescencyjnych widm wzbudzenia-emisji zaawansowanymi metodami chemometrycznymi?

W pracy P4 zamieszczony jest rysunek 3, który przedstawia zmianę promienia hydrodynamicznego i potencjału ζ kropek kwantowych po zmieszaniu ich z jednym z A β . W materiałach uzupełniających do artykułu wskazano, że średnica komercyjnie dostępnych kropek kwantowych wynosi 1,5 nm. Z rys. 3 wynika, że zakres średnic kropek kwantowych przed ich agregacją powodowaną przez oddziaływanie z A β mieści się w zakresie 10-100 nm. Proszę o komentarz.

Podsumowanie

Po lekturze przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej mogę jednoznacznie stwierdzić, że Doktorantka wykazała, że posiada merytoryczne przygotowanie do prowadzonych przez siebie badań co uwidocznione zostało w bardzo dobrze zredagowanym wstępie poprzedzającym serię artykułów. Wszystkie eksperymenty zaplanowane zostały metodologicznie i przeprowadzone zgodnie z wymogami chemii analitycznej. Wszystkie analizy wykonano za pomocą odpowiednich technik w odniesieniu do prób referencyjnych. W trakcie badań Doktorantka opracowała nowatorską metodę wykorzystania jednego rodzaju kropek kwantowych do rozróżniania jakościowego i ilościowego związków o bardzo podobnej strukturze chemicznej. Pozwala to na szybkie i nieinwazyjne badanie próbek wieloskładnikowych bez konieczności wcześniejszego rozdzielania związków dzięki analizie zestawów fluorescencyjnych widm wzbudzenia-emisji kropek kwantowych z analitem. Zawarte w tej recenzji krytyczne uwagi nie wpływają na bardzo pozytywną ocenę niniejszej pracy. W związku z powyższym, uważam, że rozprawa doktorska magister inżynier Klaudii Głowacz pt. „Fluorescencja multispektralna i metody chemometryczne w zastosowaniach (bio)analitycznych” spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późniejszymi zmianami). Na tej podstawie wnioskuję o dopuszczenie mgr inż. Klaudię Głowacz do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora. Mając na uwadze opisane w niniejszej pracy badania naukowe, które doprowadziły do opracowania procedur jednoczesnego oznaczania i rozróżniania wielu neuroprzekazników i krótkich peptydów β -amyloidowych w próbkach wieloskładnikowych przy użyciu oryginalnego podejścia z zastosowaniem jednego typu kropek kwantowych wnoszę o wyróżnienie tej rozprawy.



Joanna Niedziółka-Jönsson