

11.06.2024, Gdańsk

Dr hab. inż. Justyna Płotka-Wasyłka, prof. uczelni
Katedra Chemii Analitycznej
Wydział Chemiczny
Politechnika Gdańska

**Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr inż. Anny Marii Wróblewskiej**

zatytułowanej:

„Zastosowanie technik łączonych z detekcją spektrometrii mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie do badania układów typu nanonośnik–cisplatyna”

1. Przedmiot recenzji

Przedmiotem recenzji jest rozprawa doktorska mgr inż. Anny Marii Wróblewskiej, pt.: „Zastosowanie technik łączonych z detekcją spektrometrii mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie do badania układów typu nanonośnik–cisplatyna” ubiegającej się o stopień doktora w dziedzinie nauki ścisłe i przyrodnicze, w dyscyplinie nauki chemiczne przed Radą Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej. Promotorem rozprawy doktorskiej jest dr hab. inż. Lena Ruzik, profesor uczelni, natomiast rolę promotora pomocniczego pełniła dr hab. inż. Magdalena Matczuk. Praca realizowana była w Katedrze Chemii Analitycznej na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej.

2. Ocena wyboru tematyki badawczej

Problematyka badawcza podjęta przez Panią mgr inż. Annę Marię Wróblewską dotycząca opracowania nowych metod analitycznych do badania układów typu nanonośnik-cisplastyna jako potencjalnych produktów leczniczych, opartych o wykorzystanie technik łączonych, tj. CZE-ICP-MS i/lub HPLC-ICP-MS, doskonale wpisuje się w aktualne trendy poszukiwania:



- a) nowych metod otrzymywania stabilnych układów nanonośnik–lek przeciwnowotworowy,
- b) nowych narzędzi analitycznych do bezpośredniego monitorowania *układów typu nanonośnik-lek przeciwnowotworowy* jako potencjalnych produktów leczniczych, w jednym toku postępowania analitycznego.

Uważam za w pełni uzasadnione zaproponowanie do oznaczeń końcowych technik łączonych, a mianowicie strefowej elektroforezy kapilarnej czy też wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonych z tandemowym spektrometrią mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie (odpowiednio: HPLC-ICP-MS(/MS) I CZE-ICP-MS(/MS)). Takie postępowanie umożliwiło badanie procesów otrzymywania układów nanonośnik–cisplatyna i ich stabilności poprzez jednoczesną analizę jakościową i ilościową zarówno form metaloleku, jak i nanonośnika.

Badania, których podjęła się Doktorantka miały charakter interdyscyplinarny. Plan badawczy nie był ograniczony wyłącznie do opracowania nowych procedur analitycznych, z uwzględnieniem potrzeby analizy bezpośredniej w czasie rzeczywistym zachodzącej reakcji, ale był wzbogacony o opracowanie prostych metod tworzenia systemów dostarczania wiodącego leku przeciwnowotworowego opartego na platynie (cisplatyny) wykorzystujących jako nośnik dobrze poznane i określane jako nietoksyczne nanomateriały dwóch różnych klas: nanocząstki złota (nanomateriały metaliczne) i liposomy (nanomateriały organiczne).

Dużym wyzwaniem było też dokonanie charakterystyki wydajności wiązania/kapsułkowania metaloleku w zależności od zmiennych parametrów ich tworzenia. Dodatkowo, Doktorantka pokusiła się o ocenę potencjału zaproponowanych metod analitycznych w badaniach stabilności wybranych połączeń w czasie i w obecności białka surowiczego.

Pomysł przeprowadzenia badań, a także uzyskane jego wyniki uważam za bardzo interesujący, oryginalny i o znaczeniu poznawczym. Dlatego też nie mam wątpliwości, że wybór problemu naukowego spełnia wymagania, które są stawiane rozprawom doktorskim.

2. Ocena formalna i merytoryczna rozprawy

Przedstawiona do oceny dysertacja to zbiór 5 publikacji naukowych. Praca napisana jest według nowego stylu tzn. zawiera krótkie wprowadzenie do tematyki i cykl pięciu publikacji stanowiących jednolitą całość. Recenzowana praca została przygotowana w języku polskim. Jej format jest typowy dla rozpraw doktorskich

powstałych w oparciu o cykl publikacji naukowych. Załączone kopie publikacji, które są podstawą rozprawy, poprzedza wstęp Autorki obejmujący: streszczenie (w języku polskim i angielskim), wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy wraz z podanymi wartościami współczynnika oddziaływania Impact Factor (IF) czasopism oraz z wartościami punktów ministerialnych za poszczególne czasopisma i wartością liczby cytowań danej pracy, listę stosowanych skrótów, krótki komentarz Autorki zawierający wprowadzenie do tematyki rozprawy wraz z podsumowaniem, oświadczenia współautorów opublikowanych prac stanowiących podstawę ocenianej rozprawy doktorskiej, bibliografię oraz spis rysunków i tabel. Pracę wieńczy przedstawienie życiorysu naukowego Doktorantki.

Poprzedzający publikację komentarz Autorki obejmuje 65 stron i zawiera wprowadzenie do tematyki badawczej, składające się z czterech rozdziałów, omówienie osiągnięć badawczych oparte o: przedstawienie zarysu poprzez wykazanie luki badawczej odkrytej w literaturze przedmiotu, przedstawienie celu pracy oraz przewodnik zagadnień omawianych w poszczególnych publikacjach prezentowanych w załącznikach P1-P5. Doktorantka zacytowała 148 pozycji literaturowych.

Pani mgr inż. Anna Maria Wróblewska wytyczyła nadrzędny cel rozprawy doktorskiej jakim było opracowanie metod analitycznych wykorzystujących techniki łączone ze specyficzną izotopowo detekcją ICP-MS, umożliwiającymi badanie procesów otrzymywania układów nanonośnik–cisplatyna i ich stabilności poprzez jednoczesną analizę jakościową i ilościową zarówno form metaloleku, jak i nanonośnika. W celu realizacji tego założenia Doktorantka sformułowała VII hipotez badawczych, które sukcesywnie weryfikowała w trakcie czteroletniej pracy laboratoryjnej.

Wyczerpującą odpowiedzią na tak sprecyzowany cel rozprawy są wyniki badań opisane w czterech artykułach opublikowanych w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports*, a są to:

- A.M. Wróblewska, N. Gos, J. Zajda, L. Ruzik, M. Matczuk, Drawbacks in the efficient monitoring of gold nanoparticle-based cisplatin delivery systems formation by HPLC-ICP-MS. *Metallomics*. 2023, 15, mfad002 (1–10) **(P2)**
- A.M. Wróblewska, A. Milewska, M. Drozd, M. Matczuk, Targeted delivery of cisplatin by gold nanoparticles: the influence of nanocarrier surface modification type on the efficiency of drug binding examined by CE-ICP-MS/MS. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, 23, 2324 (1–17). **(P3)**
- A.M. Wróblewska, J. Samsonowicz-Górski, E. Kamińska, M. Drozd, M. Matczuk, Optimization of a CE-ICP-MS/MS method for the investigation of liposome–

cisplatin nanosystems and their interactions with transferrin. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2022, 37, 1442–1449. **(P4)**

- A.M. Wróblewska, E. Łukawska, Z. Wakuła, J. Zajda, B.K. Keppler, A.R. Timerbaev, M. Matczuk, Toward the boosted loading of cisplatin drug into liposome nanocarriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2024, 198, 114245 (1–8). **(P5)**

Ponadto, w cyklu prac znalazła się jedna praca przeglądowa, która nie tylko stała się motywacją do wytyczenia i realizacji podjętych zadań, ale też zapewne pomogła przy interpretacji wyników doświadczalnych i była dobrym wprowadzeniem do dalszych badań naukowych Doktorantki. Jest to następująca publikacja:

- J. Zajda, A.M. Wróblewska, L. Ruzik, M. Matczuk, Methodology for characterization of platinum-based drug's targeted delivery nanosystems. *Journal of Controlled Release*, 2021, 335, 179–190. **(P1)**

Pragnę zauważyć, że Doktorantka jest pierwszą autorką w czterech pracach naukowych, zaś w jednej publikacji jest drugim autorem pracy. Doktorantka nie objęła funkcji autora korespondencyjnego w żadnej pracy. Niemniej jednak, pierwsza pozycja wśród autorów w większości prac, oraz oświadczenia współautorów, świadczą nie tylko o jej wiodącym wkładzie w cały proces badawczy i publikacyjny, ale też o dużej dojrzałości naukowej.

W załączonym wykazie są artykuły, które ukazały się w bardzo dobrych czasopismach naukowych, takich jak: *Metallomics* (RSC), *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* (RSC), czy *Journal of Controlled Release* (Elsevier). Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF) zgodny z rokiem opublikowania dla prac wchodzących w skład rozprawy wynosi 28,767, natomiast uśredniona wartość IF dla wymienionych prac naukowych wynosi 5,753. Liczba cytowani tych prac jest na poziomie 30. Te parametry świadczą o aktualnej tematyce rozprawy.

Wszystkie prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej zostały przez Doktorantkę opublikowane w recenzowanych czasopismach naukowych i były wcześniej poddane merytorycznej analizie przez niezależnych Recenzentów i ocenione przez nich pozytywnie. Dlatego wartość merytoryczna publikacji nie podlega dyskusji i dalszej ocenie. Do poszczególnych prac zostały zamieszczone oświadczenia Doktorantki i współautorów o ich udziale w przygotowaniu artykułów, które wyraźnie wskazują na wiodącą rolę Pani mgr inż. Anny Marii Wróblewskiej w opracowaniu



koncepcji publikacji, wykonaniu badań eksperymentalnych, interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptów.

Wystąpienia na konferencjach międzynarodowych i krajowych, nagrody, udział w projektach badawczych potwierdzają dużą naukową aktywność Doktorantki. W aktywności tej brakuje jednak staży zagranicznych, które zawsze pozwalają na zdobycie innego rodzaju doświadczenia.

Za najbardziej wartościowe w przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej uważam:

- a) opracowanie dwóch rodzajów DDS, różniących się typem nanomateriału służącego jako nośnik cisplatyny;
- b) określenie wpływu różnych czynników na tworzenie DDS i wydajność wiązania przeznie cisplatyny, co może zostać wykorzystane w innych pracach badawczych;
- c) opracowanie dwóch nowatorskich metod analitycznych, opartych o technikę łączoną CZE-ICP-MS/MS do bezpośredniego monitorowania *układów typu nanonośnik-lek przeciwnowotworowy* jako potencjalnych produktów leczniczych, w jednym toku postępowania analitycznego;
- d) zaproponowanie metod analitycznych umożliwiających badania stabilności połączeń AuNP–cisplatylna i liposom–cisplatylna w obecności białek surowiczych.

Wierzę, że uzyskana wiedza oraz podane narzędzia stanowią będą motywacją, ale i podstawę do dalszych badań układów DDS jako potencjalnych produktów leczniczych w zakresie chorób nowotworowych.

3. Uwagi

Recenzent poza oczywistym podkreśleniem walorów i zalet pracy ma także obowiązek wskazania pewnych błędów, uwag i postawienia pytań, co poniżej czynię.

Pierwszy komentarz dotyczy przedstawienia całej pracy. W mojej opinii, kwestia przedstawienia danych elementów niniejszej rozprawy nie została do końca przemyślana. Przykładowo, bibliografia do komentarza Autorki pracy została oddzielona artykułami oraz oświadczeniami współautorów. Spis treści, został zaprezentowany po streszczeniu pracy. Można by polemizować w jeszcze innych kilku kwestiach. Być może te kwestie wynikają z wytycznych na uczelni. Jest to drobiazg, który nie wpłynął na merytoryczną wartość pracy.

Rozprawa mgr inż. Anny Marii Wróblewskiej jest przygotowana starannie; tabele, rysunki i znajdujące się opisy są czytelne, choć zdarzają się w tekście



niedociągnięcia, typu błędów stylistycznych, literówek. Często zostały zastosowane skróty, zanim wprowadzono ich pełne rozwinięcie. Doskonałym przykładem jest już Streszczenie Rozprawy Doktorskiej i wprowadzenie skrótów technik łączonych, tj. CZE-ICP-MS, HPLC-ICP-MS, ICP-MS/MS. Na stronie 8 w drugim paragrafie podaje Pani w połowie pełną nazwę techniki, a drugą część piszę skrótem (tandemowej spektrometrii mas ICP), co też nie jest odpowiednim podejściem. Takich przykładów w pracy można znaleźć dosyć sporo.

Nawiązując do skrótów to w ich wykazie, można zauważyć, że nie wszystkie zostały wyjaśnione w sposób prawidłowy. Przykładem może być: CE- kapilarne techniki elektroforetyczne (ang. capillary electrophoresis techniques), podczas gdy w pracy opisuje Pani (prawidłowo) jako elektroforeza kapilarna. Kolejne przykłady to: CZE-DRC-ICP-MS, SEC-DRC-ICP-MS, itd. Ponadto, opis skrótów nie jest ujednolicony. Do niektórych technik wprowadza Pani odpowiednio wyłącznie nazwę techniki, jak np. dla RP-HPLC, a dla innych, bardziej Pani daną technikę opisuje, jak np. do skrótu CZE-ICP-MS(/MS) – technika łączona będąca połączeniem technik strefowej elektroforezy kapilarnej i (tandemowej) spektrometrii mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie. Zastanawia mnie też fakt dalszego dla niektórych nazw technik podaje Pani rozwinięcie anglojęzyczne, a dla innych nie.

Wśród innych niedociągnięć w pracy, uwag dyskusyjnych i merytorycznych, a także pytań trzeba wymienić:

- Cele pracy opisane w dysertacji mogłyby być lepiej wyróżnione/wyeksponowane co ułatwiłoby czytanie pracy, na przykład poprzez przypisanie im kolejno numerów. Tak jak to zostało zrobione dla hipotez badawczych;
- W części omawiającej osiągnięć badawczych często brakuje referencji do przytaczanych danych publikacyjnych (str.55-60), np. ostatni paragraf str.57;
- Brak porównania procedur opartych na HPLC i CE sprzężonych z ICP-MS/MS w formie tabelarycznej (m.in. parametrów walidacyjnych, odzysku), co znacznie ułatwiłoby śledzenie parametrów obu procedur;
- Podpis do Rysunku 13 jest nieprawidłowy, gdyż rysunek nie przedstawia "analizy" próbki;
- Na stronie 68 opisano znaczenie i działanie techniki ICP-MS, co powinno zostać zawarte w rozdziale 4.2.1., który skupia się na opisie tej techniki pomiarowej;
- Często opiera Pani wybór metody do dalszych prac badawczych o odzysk analitu. Dlaczego? Chciałabym też prosić o komentarz do zdania: "W postępowaniach tych często nie jest sprawdzany parameter odzysku analitu, co



znacząco zmniejsza ich wiarygodność analityczną.” (str. 57). Jakie warunki/parametry świadczą o wiarygodności uzyskanych wyników analizy i wyników procesu walidacji?

- Proszę o komentarz do stwierdzenia: “Z powyższych obserwacji wynika, że na **aktualnym etapie rozwoju**, metoda analityczna wykorzystująca rozdzielanie chromatograficzne RP-HPLC nie może być stosowana w celu jakościowego i ilościowego monitorowania otrzymywania $Pt^{t}DDS$.”
- Czy kalkulowała Pani efekty matrycowe dla zaproponowanych procedur?

4. Podsumowanie recenzji

Stwierdzam, że mgr inż. Anna Maria Wróblewska wykazała się wiedzą w aktualnej i ważnej tematyce będącej przedmiotem rozprawy doktorskiej, a wskazane w recenzji błędy i uwagi nie umniejszają wartości dysertacji, którą oceniam wysoko i dlatego wnoszę o jej wyróżnienie. Praca spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (aktualne odniesienie do aktu prawnego - tekst jednolity: DzU z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.).

Przedłożona do recenzji praca prezentuje wysoki poziom, biorąc pod uwagę rangę rozwiązywanego problemu, ale też zakresu i jakość przeprowadzonych badań. Ponadto, wyróżnia się oryginalnością zastosowanych metod i narzędzi badawczych. Dodatkowo, posiada szczególne walory poznawcze i użytkowe.

Wniosek końcowy

Podsumowując, recenzowana rozprawa mgr inż. Anny Marii Wróblewskiej zatytułowana „Zastosowanie technik łączonych z detekcją spektrometrii mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie do badania układów typu nanonośnik–cisplatyna” spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim, wnoszę o dopuszczenie jej Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Justyna Polka-Waryłka