



RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Joanny KRUSZEWSKIEJ
pt: *Zastosowanie spektrometrii mas do badania wewnątrzkomórkowych przemian metalonanomateriałów o potencjalnych właściwościach terapeutyczno-diagnostycznych* wykonanej na Wydziale Chemii Politechniki Warszawskiej pod kierunkiem: prof. dr hab. inż. Macieja Jarosza (promotor) i dr inż. Magdaleny Matczuk (promotor pomocniczy)

Jak zauważa Autorka ocenianej dysertacji zachorowalność na choroby nowotworowe a w konsekwencji wzrost liczby zgonów powoduje niepowetowane straty cywilizacyjne jak i ekonomiczne. Stąd ciągle trwają intensywne poszukiwania szybkiej diagnostyki, efektywnego i skutecznego leczenia oraz minimalizacji negatywnych skutków ubocznych terapii. Jednym z głównych warunków skutecznej terapii jest poszukiwanie nowej generacji leków. Stąd w realizacji tego społecznego i medycznego wyzwania uczestniczą tylko najlepsze laboratoria technologiczne ale przede wszystkim analityczne z nastawieniem biotechnologicznym. Wprawdzie od dawna prowadzone są badania nad poszukiwaniem skutecznych leków do prowadzenia chemioterapii, bazujących na kompleksach metaloorganicznych (np. platyna, złoto, cynku, ruten, etc), ciągle jednak jest brak selektywnych, dedykowanych preparatów rekomendowanych do tzw. terapii spersonalizowanej. Na podstawie właśnie trafnej diagnozy możliwe jest podjęcie skutecznej terapii, doprowadzającej do wyleczenia czy poprawy komfortu życia pacjenta pod warunkiem stosowania nowej generacji selektywnych leków, skutecznie zwalczających chorobę. Od pewnego czasu w kręgu zainteresowania badaczy są układy nano- w formie nanokompleksów wspomnianych nośników metalu z depozycją organiczną czy tzw. kropek kwantowych np. połączenia typu CdSeS/ZnS. Poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za formowanie się ich oraz metabolizm, transport i ukierunkowanie szlaków na poziomie komórkowym to kolejny argument skutecznej terapii. Stąd niezbędną wydaje się ścisła współpraca chemików syntetyków z analitykami. Dzięki temu możliwe jest przeprowadzenie skomplikowanych operacji korygujących procesy technologiczne z oznaczaniem jakościowym i ilościowym substancji biologicznie czynnej, w tym specjacji, z zastosowaniem różnych układów detekcyjnych. Przykładem

tego postępowania jest kompleksowa, wielowymiarowa analiza chemiczna realizowana z wykorzystaniem hybrydowych modułów tj.: chromatografia (LC w różnym modusie) czy techniki elektromigracyjne (CZE, ITP) połączone ze spektrometrią z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie (ICP) i spektrometrią mas (MS) w różnych konfiguracjach i wariantach tj. CZE-ICP-ESI-MS/MS i/lub μ HPLC-ICP-ESI-MS/MS, które od wielu lat z dużym powodzeniem w Polsce rozwija prof. dr hab. inż. Maciej Jarosz.

Zagadnieniom tym poświęcona jest rozprawa opracowana przez mgr inż. Joannę Kruszewską. Dotyczy ona opisu metodyk analitycznych związanych z mechanizmami wewnątrzkomórkowych przemian metalonanomaterialów o potencjalnym zastosowaniu w diagnostyce i terapii w chorobach nowotworowych.

Ocenianą rozprawę doktorską mgr inż. Joanny Kruszewskiej stanowi zwarte 95 stronicowe opracowanie składające się z pięciu części (wprowadzenie, część literaturowa i doświadczalna, wnioski i bibliografia) podzielonych na szczegółowe rozdziały. Całość zaopatrzona jest w streszczenie w języku angielskim, listę publikacji stanowiących bazę niniejszej rozprawy doktorskiej oraz wykaz stosowanych skrótów i akronimów.

Część literaturowa wprowadza czytelnika w świat chorób nowotworowych, mechanizmów i towarzyszącym im przemian. Innym ważnym zagadnieniem poruszonym w tej części są leki o wymiarze nanocząstek (kuliste nanocząstki złota) i tzw. kropki kwantowe (o rdzeniu CdSe i otoczce ZnS)CdSeS/ZnS) o ściśle zdefiniowanej architekturze i właściwościach. Materiały te mogą być funkcjonalizowane przez biokompatybilne materiały umożliwiając transport celowany do komórek nowotworowych. Dzięki właściwościom fluorescencyjnym materiały te stanowią obiecujący obiekt nanoplatform przeznaczonych do obrazowania i leczenia raka. Świetnie to Autorka przedstawiła na rys. 4, gdzie w sposób jednoznaczny widać omawiane zależności i synergię. Podobnie pomysł zawarty przy schemacie-rys. 5 pokazuje zależności analityczne.

Oceniana dysertacja bazuje na 3 oryginalnych pracach wieloautorskich, opublikowanych w specjalistycznych czasopismach z listy JCR (*Anal. Biochem.*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* i *J. Pharm. Biomed. Anal.*). Pozycja Doktorantki (pierwszy autor) sugeruje jednoznacznie Jej wiodące autorstwo. Bibliografia, na którą składają się 173 pozycje literaturowe świadczy o dobrym przygotowaniu do realizacji wytyczonych przez Promotorów zadań, choć szkoda, że pominęła Pani w swoich rozważaniach pracę opublikowaną w *JACS* **138**, 25 (2016) 7899-7909. Trzeba w tym miejscu zaznaczyć, że cytowana literatura jest stosunkowo „młoda”, i w zdecydowanej większości dotyczy ostatniej dekady. Ze względu na układ i wymogi formalne (postępowanie wg tzw. nowej procedury) niniejsze opracowanie podoba mi się i nie wnoszę żadnych zastrzeżeń.

Problematyka, realizacji której podjęła się Doktorantka należy do trudnych z punktu widzenia opanowania warsztatu badawczego jak i wiedzy ogólnej. Charakteryzuje ją, jak wspomniałem wcześniej, interdyscyplinarne podejście do rozwiązywanych problemów i umiejętność pracy w zespole. I to w zespole specjalistów różnych specjalności. Tego typu badania stanowią najwyższy stopień umiejętności łączenia osiągnięć teoretycznych z praktyką, które decydują o tzw. „nowości naukowej”. Dlatego też słowa uznania należą się nie tylko Doktorantce, ale przede wszystkim Promotorom, za trafne sformułowanie tematu rozprawy i konsekwentną jego realizację. Tematyka ma również wymiar aplikacyjny, jako że może stać się podstawą dalszych prób praktycznego zastosowania.

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki oceniam bardzo wysoko. Za najważniejsze osiągnięcia uważam:

1. Zastosowanie łączonych technik separacyjnych (HPLC, CZE) i jonizację w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ICP) w połączeniu ze spektrometrią mas (MS) w badaniach wewnątrzkomórkowych przemian metalonanokompozytów (o różnych składach) jako potencjalnych preparatów diagnostyczno-terapeutycznych.
2. Opracowanie oryginalnych, kompleksowych metodyk analitycznych (przygotowanie próbek i analiza jakościowa i ilościowa) oznaczanych składników wewnątrzkomórkowych analitów (składników głównych i ich pochodnych), za pomocą sprzężonych technik analitycznych.
3. Opracowanie oryginalnej metodyki analitycznej oznaczania nanocząstek wraz z depozycją białkową za pomocą sprzężenia CZE-ICP-MS i HPLC-CZE-MS, zwracając uwagę na efekt tzw. „korony białkowej”, produktu kontaktu nanocząstek metalu z białkiem pochodzącym z surowicy krwi ludzkiej. Ponadto, wykazanie że technika ICP-MS jest skuteczną metodą oznaczania różnych form metalu (złota) - nośnika nanokompozytów w wewnątrzkomórkowym cytozolu i organellach (*à la* specjacja).
4. Wykazanie, poprzez analizę porównawczą, że w oznaczaniu nanokompozytów (składnik główny i jego metabolity) dogodnym instrumentarium jest połączenie CZE lub/czy HPLC-ICP-MS, przy czym rozdzielczość sygnałów w oznaczaniu nowych form metali za pomocą HPLC w stosunku do CZE jest zdecydowanie gorsza, chociaż czułość jest zdecydowanie wyższa.
5. Zastosowanie sprzężonych i łączonych technik tj.: CZE-ESI/MS-MS oraz μ HPLC-ESI-MS/MS z wykorzystaniem postępowania proteomicznego „shotgun” oraz trawienia białek zaadsorbowanych na nanocząstce nośnika.
6. Wskazanie, że opracowane procedury po odpowiedniej modyfikacji i adaptacji możliwe jest zastosować z powodzeniem w diagnostyce klinicznej.

Jak w każdej recenzowanej pracy doszukać się można różnych uchybień i niejasności, które należy poddać dyskusji i krytyce. Z satysfakcją stwierdzam, że takich uchybień trudno „na siłę” znaleźć w ocenianym opracowaniu. Niewątpliwie jest to efekt starannej korekty Autorki, ale też i rygorystycznej oceny wyników badań przed ich opublikowaniem przez minimum dwóch - trzech niezależnych ekspertów. Wywiązując się z powierzonego obowiązku mam jednak kilka uwag i pytań:

- W pracy postuluje się, iż niewielki udział nanomateriałów w badaniach klinicznych stosowanych w terapii przeciwnowotworowej wynikać może z braku wiedzy nad mechanizmami działania wewnątrzkomórkowego omawianych układów. Czy w postawionej tezie zostały uwzględnione cytotoksyczność badanych materiałów oraz możliwość generowania artefaktów podczas proponowanych rozwiązań analityczno-instrumentalnych ?
- Dlaczego w pracy nie przedyskutowano trwałości niniejszych nanoukładów? Jaka jest stabilność dyspersyjna, termodynamiczna i kinetyczna badanych układów ?
- W części teoretycznej pracy zostały przedstawione techniki stosowane do analizy „korony białkowej”. Wymieniono techniki spektroskopowe tj.: SERS, FTIR czy NMR czy spektrometryczne, głównie przy zastosowaniu jonizacji ESI czy MALDI. Nie przedyskutowano jednak podstawowych ograniczeń tych technik, szczególnie w kontekście trudności w interpretacji uzyskanych wyników ze względu na generowane artefakty. Jak jest Pani zdanie/komentarz na ten temat?
- Jaka jest efektywność trawienia „korony białkowej” immobilizowanej na rdzeniu nieorganicznym w porównaniu z białkiem natywnym, nie-immobilizowanym? Czy w rozważaniach nad podejściem analizy proteomicznej „korony białkowej” badanych nanoukładów uwzględniono powstanie tzw. *missed cleavage sites*, zaobserwowanych np. w peptydach uzyskanych w wyniku trawienia enzymatycznego za pomocą monolitycznych reaktorów przepływowych? Jaki jest wpływ immobilizacji na strukturę IV-rzędową białka i w konsekwencji jego aktywność biologiczną ?
- Co oznaczana termin „wzbogacenie o preinkubację NPs”?
- W jaki sposób oznaczono rozmiar GNPs? Czy w rozważaniach uwzględniono również rozmiar hydrodynamiczny układu ? Co ze stabilnością dyspersji ?
- W jaki sposób zabezpieczano układ kapilarny w analizie CE przed niekontrolowaną adsorpcją i adhezją badanych układów białkowych?

Przytoczone uwagi i wątpliwości mają charakter czysto dyskusyjny i nie podważają w żadnej mierze wartości rozprawy i mojej pozytywnej jej oceny.

Reasumując, uważam, że cel pracy został **zrealizowany**, a postawione przez Autorkę tezy **znalazły potwierdzenie**. Rozprawa mgr inż. Joanny Kruszewskiej zawiera bogaty, solidny i wartościowy materiał badawczy, a Kandydatka wykazała się ponadto znajomością różnych technik analitycznych oraz metodologią badań.

Reasumując stwierdzam, że powyższe uwagi nie obniżają wartości merytorycznej ocenianej dysertacji, a większość z nich ma charakter dyskusyjny. Spodziewam się, że uzyskam na nie odpowiedź podczas publicznej obrony. Jednocześnie uważam, że w świetle obowiązujących przepisów (Ustawa z dnia 14 marca 2003 roku *O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z uzupełnieniami*) przedstawiona rozprawa spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim i **wnoszę** do Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie mgr inż. Joanny Kruszewskiej do dalszych etapów postępowania celem uzyskania stopnia **doktora nauk chemicznych**.

Jednocześnie, ze względu na to iż oceniana dysertacja ma charakter innowacyjny a swoją tematyką, zakresem (interdyscyplinarny charakter), oryginalnością, nowatorstwem i jakością wykracza poza ogólnie przyjęte standardy, co udokumentowano w pliku publikacji z listy JCR, z pełnym przekonaniem **wnoszę** do Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej *o jej wyróżnienie*.

Stary Toruń 21 październik 2019 r.



prof. zw. dr hab. Bogusław Buszewski, dr h.c. mult.
czł. koresp. PAN