

**Prof. dr hab. inż. Henryk Jeleń**  
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu  
Ul. Wojska Polskiego 31, 60-624-Poznań  
Tel: 061-8487273  
E-mail: [henryk.jelen@up.poznan.pl](mailto:henryk.jelen@up.poznan.pl)

Poznań, 01.09.2024

## **RECENZJA**

**rozprawy doktorskiej Pana mgr Radika Mametova pt. „Novel Approach Low Molecular Weight Compounds Analysis Using Nanomaterials-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry and Solid-Phase Microextraction” realizowanej pod kierunkiem dr hab. Pawła Pomastowskiego, prof. UMK jako promotora oraz dr hab. Aleksandry Radtke, prof. UMK jako kopromotora.**

Podstawą do wykonania recenzji jest pismo Pani Prodziekan ds. Ekonomicznych i Rozwoju Wydziału Chemii UMK, prof. dr hab. Renaty Gadzały–Kopciuch z dnia 20.06.2024 r. o powierzeniu funkcji recenzenta rozprawy doktorskiej Kandydata.

Praca doktorska była realizowana w Interdyscyplinarnym Centrum Nowoczesnych Technologii UMK. Została wykonana w ramach projektu NCN Preludium pt. „Development of selective coating materials based on conductive polymers for SPME fibers for analysis of VOC as potential colorectal cancer biomarkers” (Nr. 2019/35/N/ST4/04363), a także w ramach projektu NCN Preludium 16 (2018/31/N/ST4/02210).

### Wybór tematyki pracy

Organiczne związki niskocząsteczkowe (z reguły o masie cząsteczkowej < 900 Da) stanowią niezwykle interesującą grupę zarówno dla biochemików, biologów oraz chemików, głównie z uwagi na ich znaczenie w metabolizmie roślin, zwierząt i człowieka. Zarówno metabolity pierwotne, jak i wtórne klasyfikowane są w obrębie tej grupy. Wraz z dynamicznym rozwojem metabolomiki i biologii systemów znaczenie tych związków w analityce radykalnie wzrosło. Zarówno niskocząsteczkowe związki lotne (VOCs) jak i metabolity nielotne wykorzystywane są w analizie celowanej i niecelowanej w badaniach medycznych, biotechnologicznych, badaniach żywności i szeroko pojętej metabolomice. Metabolomika jest obecnie najbardziej dynamicznie rozwijającą się techniką spośród technik omicznych z punktu widzenia rozwoju i wykorzystania technik analitycznych opartych głównie na technikach chromatograficznych i spektrometrii mas. Związki niskocząsteczkowe predestynowane są do analizy za pomocą chromatografii cieczowej i gazowej, a ich rozmiary ułatwiają detekcję za pomocą większości analizatorów używanych w spektrometrii mas i interpretację widm masowych. O ile techniki łączone (głównie GC-MS, HPLC-MS czy CE-MS) są dobrze zdomowione w metabolomice i

ich elementy (techniki rozdzielania oraz analizatory w spektrometrii mas) mają długą tradycję, to najbardziej dynamicznie rozwijającym się elementem analityki związków niskocząsteczkowych są techniki przygotowania próbek oraz rozwój technik jonizacji, szczególnie w obszarze tzw. ambient ionization mass spectrometry (AIMS).

Jonizacja w ciśnieniu atmosferycznym umożliwia wysokoprzepustową analizę w czasie rzeczywistym z reguły z pominięciem chromatografii, za to w połączeniu ze spektrometrią mas wysokiej rozdzielczości, lub tandemową spektrometrią mas. Techniki jonizacji AIMS pozwalają na rozwój selektywnych metod w analizie przesiewowej, a często ilościowej i ilościowej. Obszar ten jest przedmiotem intensywnej eksploracji i aktualnie najpopularniejszymi z nich są takie techniki jonizacji/desorpcji jak DESI (desorption electrospray ionization), DART (direct analysis in real time), PSI (paper spray ionization). Pojawiło się szereg platform do analizy MS w czasie rzeczywistym, szczególnie w medycynie (iKnife, SpiderMass, MasSpec Pen).

Desorpcja/jonizacja laserem (LDI) wykorzystywana w badaniach Doktoranta wpisuje się w te nowoczesne poszukiwania metod analitycznych mogących znaleźć zastosowanie w metabolomice, naukach medycznych i innych związanych z analityką małych cząsteczek. Wielość i różnorodność technik jonizacji/desorpcji które są przedmiotem badań wiąże się głównie z wyzwaniami, które przed tymi technikami stoją. Główne wyzwania wiążą się z powtarzalnością, postacią i geometrią próbek poddanych analizie i ich wpływem na wydajność jonizacji, rolą matrycy w desorpcji i jonizacji, supresją jonów, selektywnością, by wymienić tylko te najpoważniejsze.

W te bardzo aktualne trendy wpisują się badania prowadzone w ramach ocenianej pracy doktorskiej. Wybór tematyki badawczej uważam za bardzo zasadny, wnoszący nowe elementy do analityki związków niskocząsteczkowych z potencjałem do wykorzystania w metabolomice. W pracy skupiono się na metodach izolacji metabolitów bakterii opartych na mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej (SPME) z wykorzystaniem opracowanych nowych sorbentów oraz na syntezie materiałów (matrycy) do desorpcji w jonizacji z wykorzystaniem wiązki laserowej (LDI). Obydwa te obszary mają fundamentalne znaczenie w rozwoju metod analitycznych z obszaru AIMS.

#### Formalna ocena pracy

Rozprawa została napisana w języku angielskim i stanowi kompilację 4 publikacji, które ukazały się w latach 2022 – 2024:

**[P1]** Mametov\*, R., Sagandykova, G., Monedeiro -Milanowski, M., Gabryś, D., Pomastowski, P. Electropolymerized polypyrrole-MOF composite as a coating material for SPME fiber for extraction VOCs liberated by bacteria. *Scientific Reports* (2023) 13: 8933 [<https://doi.org/10.1038/s41598-023-36081-9>]

**[P2]** Sagandykova, G.\*, Pryshchepa, O., Rafińska, K., Mametov, R., Madajski, P., Pomastowski, P. LDI-MS performance of gold nanostars as an inorganic matrix for low molecular weight analytes. *International Journal of Mass Spectrometry*. (2022) 478: 116872 [https://doi.org/10.1016/j.ijms.2022.116872]

**[P3]** Sagandykova, G.\*, Piszczek, P., Radtke, A., Mametov, R., Pryshchepa, O., Gabryś, D., Kolankowski, M., Pomastowski, P. Silver nanostructured substrates in LDI-MS of low molecular weight compounds. *Materials*. (2022) 15: 4660 [https://doi.org/10.3390/ma15134660]

**[P4]** Mametov, R.\*, Sagandykova, G., Mondeiro, F., Florkiewicz, A., Piszczek, A., Radtke, A., Pomastowski, P. Metabolic profiling of bacteria with the application of polypyrrole-MOF SPME fibers and plasmonic nanostructured LDI-MS substrates. *Scientific Reports* (2024) 24:5562. [https://doi.org/10.1038/s41598-024-56107-0]

Wszystkie publikacje są wieloautorskie, liczba współautorów to odpowiednio 5, 6, 8, 7 dla poszczególnych prac. W dwóch z wymienionych publikacji (P1 i P4) Doktorant jest pierwszym i jednocześnie korespondencyjnym autorem, w dwóch kolejnych (P2 i P3) jest 4 autorem.

Czasopisma, w których opublikowano wyniki badań należą do światowego obiegu. *Scientific Reports* należy (wg. scimagojr.com) do pierwszego kwartyła (Q1) w kategorii Multidisciplinary (15/175), *Materials* należy do Q2 w kategorii Material Science (232/637), *International Journal of Mass Spectrometry* należy do Q3 w kategorii Chemistry (528/1017) oraz także Q3 w kategorii Spectroscopy (w obrębie Chemistry) (44/78). Sumaryczny IF opublikowanych prac wynosi 14.882.

Cała rozprawa liczy 164 strony i zawiera wstęp (str. 8 – 15), cel pracy (str. 16), nakreślenie tematyki badawczej poruszanej w publikacjach (str. 17 - 26), załączone publikacje z materiałami uzupełniającymi (str. 27 – 136), podsumowanie (str. 136 – 138) oraz bibliografię (str. 138 – 144). Rozprawę uzupełniają streszczenie (dwujęzyczne), lista osiągnięć Doktoranta oraz deklaracje współautorów odnoszące się do ich udziału w realizacji publikacji będących przedmiotem rozprawy.

#### Merytoryczna ocena pracy

W pracy zawarto wyniki badań ujęte w 4 publikacjach. Opublikowane prace w momencie złożenia ich w wydawnictwie podlegały procedurze recenzji. Jako recenzent rozprawy doktorskiej zobowiązany jestem do oceny jej zawartości, a więc także jakości prac ją stanowiących. Poniższe akapity odnoszą się do poszczególnych prac stanowiących element rozprawy.

## Publikacja P1

Tematem pracy była modyfikacja sorbenta włókna SPME opartego na polipirole (PP) za pomocą złożonych struktur metaloorganicznych (MOF) - ZIF-8 w celu poprawy jego zdolności sorpcyjnych w odniesieniu do lotnych metabolitów emitowanych przez wybrane bakterie.

Uwagi szczegółowe:

W tabeli 1. porównano LOD (ng/mL) związków zawartych w mieszaninie testowej (8 związków) dla włókien pokrytych PPy@ZIF-8 w odniesieniu do tych pokrytych PP (polipirolem), które to jednoznacznie wskazują na znaczne obniżenie LOD dla modyfikowanych włókien. Szkoda, że nie pokuszono się o porównanie włókna PPy@ZIF-8 z którymś z włókien dostępnych komercyjnie, wykorzystywanym w podobnego typu badaniach. Ponieważ włókna pokryte polipirolem nie są dostępne komercyjnie, może okazać się, że modyfikacja de facto nie wnosi wiele jeśli chodzi o współczynnik wzbogacenia i selektywność ekstrakcji. Daleko nie szukając, nota aplikacyjna Agilent Technologies (SI-01251) dotycząca analizy BTEX w wodzie za pomocą SPME (włókno 75µm Carboxen/PDMS) podaje wartości MDL na poziomie od 0.40 – 0.075 µg/L w zależności od związku. W porównaniu do danych zawartych w tabeli 5 (1.67 µg/L (etylobenzen) – 18.47 µg/L (toluen) wartość te (SI-01251) wynoszące odpowiednio 0.043 i 0.065 µg/L dostarczają więcej informacji na temat ewentualnej przydatności danego włókna w wykrywaniu VOCs.

Zakres liniowości metody (Fig. 5.) dla większości wybranych związków jest satysfakcjonujący i biorąc pod uwagę pojemność włókna i sposób nasyżki (splitless) sięga 20mg/L. Dla podanych na rycinie 5 związków wartości  $R^2$  są bardzo dobre za wyjątkiem dodekanu. Autorzy tłumaczą to większą lotnością dodekanu w porównaniu do pozostałych związków przytaczając wartości  $\log K_{ow}$  w tabeli 1 (wartości literaturowe). Nie bardzo mogę się zgodzić z tym stwierdzeniem – wartości  $\log K_{ow}$  wg pubChem wynoszą dla dodekanu i etylobenzenu odpowiednio 6.10 i 3.15.

Lista związków zamieszczona w tabeli 3 (VOCs liberated by *Enterococcus faecalis* liczy tylko 12 związków. W porównaniu z tabelą 1S (która jak piszą autorzy zawierała związki zawarte w próbie kontrolnej) liczba ta jest znacznie mniejsza, aczkolwiek nadal mam wątpliwości, czy lotnym metabolitem jest D-alanina, lub czy metabolitem specyficznym, wytłumaczalnym z punktu widzenia biochemii i fizjologii jest fluoro etyn. Szkoda, że nie podano w tabelach związków charakterystycznych dla pozostałych bakterii.

W tabeli 1S. (Pełna lista związków lotnych uwalnianych przez *Enterococcus faecalis*) podano listę 91 związków, spośród których 29 nie zostało zidentyfikowanych. Podano ich czasy retencji oraz powierzchnie pików. Zazwyczaj w analizie składników volatylomu podaje się także (albo zamiast czasów retencji) indeksy retencji analizowanych związków (LRI) na kolumnie o określonej polarności. Ułatwia to znacznie proces ich identyfikacji. Nie podano

jakie były kryteria identyfikacji w oparciu o widma masowe (hit probability, match probability). Autorzy zaznaczają, że w tabeli umieszczono wszystkie związki identyfikowane (także w próbie kontrolnej), aczkolwiek wtedy zmianie powinien ulec tytuł tabeli. Niektóre ze związków (4-fluorohistamina) występują przy różnych czasach retencji ( $R_t = 2.584$  i  $3.908$  min.). Trudno też zaakceptować jako metabolity lotne bakterii takie związki jak dekstroamfetaminę, bromofluorobenzen, norpseudoefedrynę, amfetaminę, D-alaninę, fluoroetyln, N-dl-alanyloglicynę, czy pierścieniową ośmioatomową formę siarki. W zestawieniu tym ujęto także dwutlenek węgla, który był dominującym pod względem powierzchni związkiem. Praca, jako tzw. *proof of concept* jest cenna z punktu widzenia potencjalnych modyfikacji powierzchni włókna SPME, natomiast niewiele wnosi w badania nad związkami lotnymi emitowanymi przez bakterie.

### Publikacja P2

Praca poświęcona była wykorzystaniu cząsteczek (nanogwiazdek) złota (*ang. gold nanostars*) jako matrycy nieorganicznej w analizie związków niskocząsteczkowych (fosfolipidów) za pomocą spektrometrii mas z jonizacją generowaną desorpcją laserową (LDI-MS).

Główna część pracy poświęcona była syntezie nanogwiazdek złota, oraz ich szczegółowej charakterystyce za pomocą analizy XRD (dyfrakcji rentgenowska), ocenie rozkładu wielkości cząstek (DLS), potencjału zeta, a także za pomocą transmisyjnej (TEM) i skaningowej (SEM) mikroskopii elektronowej i spektroskopii UV-Vis. Część ta jest bardzo mocnym elementem publikacji. Przydatność syntetyzowanych materiałów do analiz fosfolipidów prowadzono w odniesieniu do fosfatydylocholiny, izofosfatydyloetanolaminy i fosfatydyloinozytolu.

Obserwowano tworzenie adduktów sodu i potasu dla jonów molekularnych i jony fragmentacyjne wynikające z odłączenia inozytolu, czy części kwasów tłuszczowych, także w postaci adduktów. Zaproponowano drogi fragmentacji analizowanych fosfolipidów z ich szczegółową interpretacją, co stanowi także bardzo wartościowy element publikacji.

Praca ta wnosi nowe i interesujące informacje w obszarze inżynierii materiałowej oraz spektrometrii mas stanowiąc wartościowe uzupełnienie prac z zakresu LDI-MS, a szerzej ambient ionization mass spectrometry.

### Publikacja P3

Przedmiotem publikacji było przygotowanie w formie płytek nanostrukturyzowanych substratów opartych na srebrze techniką chemicznego osadzania z fazy gazowej (CVD) do wykorzystania w desorpcji/jonizacji za pomocą lasera (LDI). Efektem było uzyskanie płytek do LDI o zróżnicowanej czułości dla różnych związków niskocząsteczkowych, szczególnie w analizie celowanej na niskich poziomach nano- i pikomolowych. Przydatność opracowanej

metody sprawdzono dla wybranych lipidów, a także wybranych aminokwasów, cukrów i kwasu szkimowego.

Otrzymane płytki zostały scharakteryzowane za pomocą elektronowej mikroskopii skaningowej (SEM) i dyfrakcji rentgenowskiej (XRD). Płytki z cząsteczkami nanosrebra o różnej wielkości i stopniu pokrycia wykazywały zróżnicowaną czułość wobec testowanych cząsteczek zarówno w jonizacji (LDI) dodatniej, jak i ujemnej (Fig. 3). Jony molekularne badanych związków tworzyły addukty z jonami srebra  $[M+^{107}\text{Ag}]^+$ . Szczegółowo omówiono jonizację badanych lipidów, w szczególności wybranych fosfolipidów (PE) i trójglicerydów. W materiałach dodatkowych podano postaci jonów molekularnych analizowanych związków (Tab. S1), ciekawa w odniesieniu do badanych związków i mogąca być problemem w aplikacjach jest nieliniowa zależność intensywności otrzymanych jonów od ilości zdeponowanego na płytce nanosrebra.

Praca wnosi dużo elementów nowości naukowej w szczególności do potencjalnej analizy celowanej wybranych, istotnych z punktu widzenia metabolizmu związków niskocząsteczkowych.

#### Publikacja P4

Tematem publikacji P4 było wykorzystanie włókien SPME opartych na polipirolu-MOF (PPy@ZIF-8) jako fazy sorpcyjnej do profilowania zarówno lotnych jak i nielotnych metabolitów drobnocząsteczkowych 8 szczepów bakterii.

W publikacji zajęto się profilowaniem glikolipidów membran bakteryjnych ekstrahowanych metodą Blight-Dyera, wykorzystując do tego NALDI (jonizację laserem z wykorzystaniem nanomateriałów opartych na srebrze). Procedurą weryfikacyjną dla identyfikacji bakterii było komercyjne rozwiązanie sprzętowe MALDI-TOF-MS (Biotyper 3.0, Bruker Daltonics).

Autorzy porównali efektywność ekstrakcji dla wytworzonego w laboratorium włókna (PPy@ZIF-8) z komercyjnie dostępnym (CAR/PDMS) w odniesieniu do mieszaniny standardów (Tabela S18), szczególnie dyskutując przyczyny różnicy w sorpcji analitów.

Brak takiego porównania artykułowałem omawiając Publikację 1.

Nanostruktury srebra porównano z matrycami organicznymi (kwas hydroksycynamonowy, HCA i kwas dihydrobenzoesowy, DHBA), badano też fazy wzrostu poszczególnych mikroorganizmów metodami turbimetrycznymi, co wg mnie stanowi o wnikliwym planowaniu doświadczenia i stanowi o jakości pracy.

Opracowany sorbent (PPy@ZIF-8) pozwolił na ekstrakcję 68 VOCs, będących metabolitami bakterii. Scharakteryzowano główne frakcje związków lotnych (związki zawierające azot, jako frakcję dominującą, Fig. 2) i wykazano zróżnicowanie profili metabolitów w zależności od metody ekstrakcji/analizy. Uzupełnieniem są wykresy zmiennych różnicujących poszczególne badane szczepy (Fig. 3). Określono także zróżnicowanie metabolitów lotnych i nielotnych poszczególnych bakterii w oparciu o metodę hierarchicznej analizy skupień (Fig.

4). Z uwagi na charakter badań (analiza niecelowana) dla lipidów ekstrahowanych na potrzeby pracy nie prowadzono identyfikacji poszczególnych sygnałów (jonów o określonej  $m/z$ ), aczkolwiek w świetle dyskusji nad korelacjami pomiędzy związkami lotnymi a nielotnymi lipidami wzbogaciłaby ona jakość tej dyskusji (jakie to związki o  $m/z$  657 i 549 są silnie związane z tworzeniem odpowiednio kwasu octowego i heptanal?). Cennym uzupełnieniem w/w publikacji są obszernie materiały uzupełniające (17 rycin i 18 tabel). Widma NALDI dawały znacznie więcej informacji (bogatsze i bardziej intensywne sygnały) niż widma otrzymane dla matryc organicznych zarówno dla frakcji metanolowej i chloroformowej. Podano zidentyfikowane związki lotne w poszczególnych szczepach oraz sygnały ( $m/z$ ) charakterystyczne dla poszczególnych szczepów/ekstraktów. W mojej opinii praca ta prezentuje możliwości proponowanej techniki ekstrakcji/ionizacji do identyfikacji profili metabolomu bakterii, zarówno frakcji związków lotnych i nielotnych. Potencjalne sprzężenie LDI z wysokorozdzielczą spektrometrią mas (np. Orbitrap), dającą możliwość identyfikacji metabolitów poprzez dokładny pomiar masy jonów molekularnych/ pseudomolekularnych/ potomnych dałoby bardzo dobre narzędzie w badaniach metabolomicznych. Publikację 4 uważam, za wartościową i dobrze napisaną, a opisane doświadczenie za ciekawe i nowatorskie.

Reasumując Doktorant zrealizował cele stawiane w rozprawie oraz wykazał się biegłością analityczną w trakcie realizowanej pracy. Pełnił kluczową rolę w tworzeniu eksperymentów opisanych w pracach P1 i P4 oraz brał istotny udział w realizacji doświadczeń opisanych w pracach P3 i P4.

Biorąc pod uwagę dokonania Doktoranta opisane w rozprawie zwracam się do Rady Dyscypliny Nauk Chemicznych Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. o dopuszczenie Pana mgr Radika Mаметowa do dalszych etapów postępowania o ubieganie się o nadanie stopnia naukowego doktora w dyscyplinie nauki chemiczne.

Prof. dr hab. inż. Henryk Jeleń