

**1. Dane naukowe wnioskodawcy**

- Imię i nazwisko: **Magdalena Matczuk**
- ORCID id: **0000-0001-5631-8163**
- ResearcherID: **T-1945-2018**

**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej**

- 2015            **Doktor nauk chemicznych** w dyscyplinie biotechnologia; Rada Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej; tytuł pracy: „Development of the analytical methodology for investigations of the anticancer metallocomplexes transportation under simulated physiological conditions”; promotorzy: prof. dr hab. inż. Maciej Jarosz (Politechnika Warszawska), prof. dr hab. Zbigniew Czarnocki (Uniwersytet Warszawski); rozprawa wyróżniona
- 2011-2015      **Studia doktoranckie** w ramach programu Międzynarodowe Projekty Doktoranckie Fundacji na rzecz Nauki Polskiej MPD/2010/4; Politechnika Warszawska, Wydział Chemiczny
- 2010            **Magister inżynier** technologii chemicznej; Politechnika Warszawska, Wydział Chemiczny; tytuł pracy: „Kontrola degradacji wybranych konserwantów w kosmetykach metodą chromatograficzną (HPLC)”; kierujący pracą: dr hab. inż. Mirosław Mojski, prof. PW
- 2005-2010      Jednolite **studia magisterskie**; kierunek Technologia Chemiczna; Politechnika Warszawska, Wydział Chemiczny; studia ukończone z wyróżnieniem

**3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych**

- 2017 – obecnie    **Adiunkt** naukowo-dydaktyczny, Politechnika Warszawska, Wydział Chemiczny
- 2016 – 2017      **Samodzielny chemik** naukowo-badawczy, Politechnika Warszawska, Wydział Chemiczny (w ramach stanowiska **PostDoc** w projekcie NCN OPUS 9: 2015/17/B/ST4/03707, Metodyki analityczne do badania specjacji wewnątrzkomórkowej metalonanomateriałów terapeutyczno-diagnostycznych: opracowanie, optymalizacja i zastosowanie in-vitro)

**4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.)**

**4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego**

Cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych pt.:

**„Metodyki charakteryzowania metalonanocząstek o potencjalnym zastosowaniu medycznym z użyciem spektrometrii mas z jonizacją w plazmie sprężonej indukcyjnie”**

**4.2. Wykaz opublikowanych prac naukowych wchodzących w skład osiągnięcia naukowego**

Na cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych, stanowiących osiągnięcie naukowe składa się **12 prac** opublikowanych w latach 2015 – 2021 w czasopismach z listy Journal Citation Reports (JCR), w których jestem współautorem. W pięciu pracach byłam autorem pierwszym, zaś w 8 pełniłam funkcję autora korespondencyjnego.

Wybrane i zestawione poniżej prace były cytowane **147 – krotnie** (w tym 109 cytowań niezależnych, dane z dnia 02.07.2021 wg Web of Science). Sumaryczny współczynnik oddziaływania (Impact Factor wg roku publikacji) jednotematycznego cyklu prac wynosi **50,905**, zaś sumaryczna liczba punktów z listy czasopism MEiN z dnia 09.02.2021 roku wynosi **1090 (Tabela 1)**.

Opis mojego merytorycznego i szacowanego procentowego wkładu pracy w publikacje będące częścią cyklu, zawarty jest w **Załączniku 4** do wniosku, oraz w oświadczeniu (**Załącznik 5**). Dodatkowo oświadczenia współautorów, określające indywidualny wkład pracy każdego z nich w publikacjach [**H1–H12**] stanowią treść **Załącznika 6** do wniosku.

\* – autor korespondencyjny

[H1] **M. Matczuk**, K. Anecka, F. Scaletti, L. Messori, B.K. Keppler, A.R. Timerbaev\*, M. Jarosz, *Speciation of metal-based nanomaterials in human serum characterized by capillary electrophoresis coupled to ICP-MS: a case study of gold nanoparticles*, Metallomics 2015, 7, 1364–1370.

[H2] **M. Matczuk**, J. Legat, S.N. Shtykov, M. Jarosz, A.R. Timerbaev\*, *Characterization of the protein corona of gold nanoparticles by an advanced treatment of CE-ICP-MS data*, Electrophoresis 2016, 37, 2257–2259.

[H3] **M. Matczuk\***, J. Legat, A.R. Timerbaev\*, M. Jarosz, *A sensitive and versatile method for characterization of protein-mediated transformations of quantum dots*, Analyst 2016, 141, 2574–2580.

- [H4] **M. Matczuk\***, J. Legat, F. Scaletti, L. Messori, A.R. Timerbaev, M. Jarosz, *The fate of differently functionalized gold nanorods in human serum: A response from capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry*, J. Chromatogr., A 2017, 1499, 222–225.
- [H5] S.S. Aleksenko, **M. Matczuk\***, A.R. Timerbaev\*, *Characterization of interactions of metal-containing nanoparticles with biomolecules by CE: An update (2012-2016)*, Electrophoresis 2017, 38, 1661–1668.
- [H6] **M. Matczuk**, L. Ruzik, S.S. Aleksenko, B.K. Keppler, M. Jarosz, A.R. Timerbaev\*, *Analytical methodology for studying cellular uptake, processing and localization of gold nanoparticles*, Anal. Chim. Acta 2019, 1052, 1–9.
- [H7] J. Kruszewska, A. Kur, D. Kulpińska, I. Grabowska-Jadach, **M. Matczuk**, B.K. Keppler, A.R. Timerbaev\*, M. Jarosz, *An improved protocol for ICP-MS-based assessment of the cellular uptake of metal-based nanoparticles*, J. Pharm. Biomed. Anal 2019, 174, 300–304.
- [H8] J. Legat, **M. Matczuk\***, A.R. Timerbaev, M. Jarosz, *Cellular processing of gold nanoparticles: CE-ICP-MS evidence for the speciation changes in human cytosol*, Anal. Bioanal. Chem. 2018, 410, 1151–1156.
- [H9] J. Kruszewska, D. Kulpińska, I. Grabowska-Jadach, **M. Matczuk\***, *Joint forces of direct, single particle, CE- and HPLC-inductively coupled plasma mass spectrometry techniques for the examination of gold nanoparticle accumulation, distribution and changes inside human cells*, Metallomics 2020, 12, 408–415.
- [H10] J. Kruszewska, J. Sikorski, J. Samsonowicz-Górski, **M. Matczuk\***, *A CE-ICP-MS/MS method for the determination of superparamagnetic iron oxide nanoparticles under simulated physiological conditions*, Anal. Bioanal. Chem. 2020, 412, 8145–8153.
- [H11] A. Wróblewska, **M. Matczuk\***, *First application of CE-ICP-MS for monitoring the formation of cisplatin targeting delivery systems with gold nanocarriers*, Electrophoresis 2020, 41, 394–398.
- [H12] J. Zajda, A. Wróblewska, L. Ruzik, **M. Matczuk\***, *Methodology for characterization of platinum-based drug's targeted delivery nanosystems*, J. Control. Release 2021, 335, 178–190.

**Tabela 1** Cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych „Metodyki charakteryzowania metalonanozłatek o potencjalnym zastosowaniu medycznym z użyciem spektrometrii mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcją” – podsumowanie

Lp.	Publikacja	IF*	Liczba cytowań wg WoS	Liczba punktów MEiN
H1	Metallomics 2015, 7, 1364-1370	3,540	41	100
H2	Electrophoresis 2016, 37, 2257-2259	2,744	21	70
H3	Analyst 2016, 141, 2574-2580	3,885	11	100
H4	J. Chromatogr., A 2017, 1499, 222-225	3,716	15	100
H5	Electrophoresis 2017, 38. 1661-1668	2,569	19	70
H6	Anal. Chim. Acta 2019, 1052, 1-9	5,977	16	100
H7	J. Pharm. Biomed. Anal 2019, 174, 300-304	3,209	6	100
H8	Anal. Bioanal. Chem. 2018, 410, 1151-1156	3,286	14	70
H9	Metallomics 2020, 12, 408-415	4,526	4	100
H10	Anal. Bioanal. Chem. 2020, 412, 8145-8153	4,142	0	70
H11	Electrophoresis 2020, 41, 394-398	3,535	0	70
H12	J. Control. Release 2021, 335, 178-190	9,776	0	140
<b>SUMA</b>		<b>50,905</b>	<b>147</b>	<b>1090</b>

\* wg roku publikacji lub z 2020, gdy brak nowszego

### 4.3. Opis badań, będących podstawą osiągnięcia naukowego

#### 4.3.1. Wprowadzenie i cele badawcze

Nanomateriały (NMs, ang. *nanomaterials*) to indywidualne chemiczne, charakteryzujące się przynajmniej jednym wymiarem w przestrzeni mniejszym niż 100 nm. Dodatkowo, jako kryterium kwalifikacji tego typu materiałów, wyróżnia się często odmienną wykazywaną właściwość fizycznych i chemicznych w porównaniu do form jonowych pierwiastków chemicznych. Unikatowość tych cech jest podstawą nowoczesnych zastosowań NMs w życiu codziennym, między innymi w nanomedycynie. Aktualnie stosuje się już bądź przeprowadza z ich użyciem badania testowe (zarówno kliniczne, jak i prowadzone na modelach *in vitro/in vivo* na komórkach/zwierzętach), wiele różnego rodzaju struktur nanometrycznych. Ważne miejsce w opracowywaniu nowych rozwiązań nanomedycznych zajmuje onkologia – dziedzina borykająca się z problemami zbyt małej skuteczności działania i mnogością skutków ubocznych obecnie stosowanych terapii. NMs o potencjalnym zastosowaniu medycznym (określane jako medycznie atrakcyjne), charakteryzują się biokompatybilnością a także zdolnością do selektywnego i szybkiego transportu do komórek zmienionych nowotworowo m.in. dzięki występowaniu efektu wzmożonego przenikania i zatrzymywania (EPR, ang. *enhanced permeation and retention*). Charakterystyczne cechy fizyko-chemiczne NMs powodują również, że mogą one być rozważane jako: (i) narzędzia diagnostyczne, służące do obrazowania obszarów zmienionych nowotworowo; (ii) nośniki leków/radionuklidów/genów; (iii) czynniki stosowane w radioterapii/terapii fototermicznej, czy fotodynamicznej. Pożądane jest także, by projektowane NMs łączyły w sobie powyższe funkcje, tak by możliwe było jednoczesne (i realizowane podczas jednego podania) diagnozowanie i leczenie nowotworu, wpisujące się w zasady tzw. teranostyki. Możliwości zastosowania NMs i uznania ich za medycznie atrakcyjne są ściśle związane z ich budową, rozmiarem, kształtem, modyfikacją powierzchni i obecnością tzw. grup kierunkujących (funkcyjnych). Jednymi z najczęściej testowanych pod kątem ukierunkowania na transport do komórek nowotworowych są nanocząstki (NPs, ang. *nanoparticles*), czyli struktury, których trzy wymiary spełniają kryterium nanometryczne (< 100 nm). Istotną rolę pośród nich odgrywają metalnanocząstki (MNPs, ang. *metallonanoparticles* lub *metal-based nanoparticles*), których rdzenie składają się głównie z metali/tlenków metali i które posiadają zdolność transformowania promieniowania elektromagnetycznego.

Zależność między budową MNPs a ich właściwościami, decyduje o ich atrakcyjności medycznej powodując, że badania nad syntezyzowaniem/modyfikowaniem MNPs, a także testowaniem ich zdolności diagnostycznej/terapeutycznej/teranostycznej w stadium przedklinicznym cieszą się ogromną popularnością badaczy na całym świecie. Wydaje się jednak, że duża liczba przeprowadzanych doświadczeń nie jest proporcjonalna do liczby oficjalnie zarejestrowanych rozwiązań. Jedną z przyczyn takiego stanu jest niewątpliwie intensyfikacja prac skupionych wokół otrzymywania kolejnych MNPs i ich testowania *in vitro* na komórkach lub *in vivo* na zwierzętach za pomocą postępowań opracowanych wiele lat temu. W postępowaniach tych doświadczenia prowadzone są często w warunkach różniących się od panujących w ciele ludzkim. Często pomijane jest zjawisko tworzenia się

na powierzchni MNPs tzw. koron z białek surowiczych a materiał stosowany jest w formie podstawowej (a nie metabolicznej) w testach toksyczności, pobierania i dystrybucji w komórkach nowotworowych linii hodowlanych. Postępowania takie często nie są poprzedzane studium badań przedklinicznych, dotyczącym ustalania mechanizmów i ścieżek transportu MNPs w warunkach symulowanych organizmu ludzkiego lub ograniczane jedynie do charakterystyki parametrów fizyko-chemicznych badanych NPs. Znaczącą przeszkodą w kwalifikowaniu MNPs jako materiałów nanomedycznych wydaje się być również nieodpowiedni dobór narzędzi analitycznych stosowanych do ich charakteryzowania (a także ich zmian) podczas testowania. W powszechnym użyciu są ciągle (i w przeważającej większości) rozwiązania oparte na analizie jakościowej lub jedynie półilościowej, nie wykorzystujące w pełni potencjału ciągle rozwijających się zaawansowanych technik analitycznych. Ponadto interdyscyplinarność tematyki badań na pograniczu chemii, biologii i medycyny wiąże się często, w istniejących opracowaniach, z ograniczeniem dokładnego opisu zastosowanej metodyki oraz charakterystyki parametrów metody analitycznej.

*Przedłożony cykl artykułów naukowych jest odpowiedzią na wyżej przedstawione problemy badawcze i obejmuje realizację celów naukowych, proponujących:*

- nowatorskie metodyki jakościowego i ilościowego monitorowania zmian wybranych MNPs w surowicy krwi ludzkiej, wraz z wykazaniem wpływu parametrów NMs na ich zmiany w powinowactwie względem głównych białek transportujących [H1-H5];
- nowe podejścia w badaniach *in vitro* wybranych MNPs, dotyczących ich pobierania, umiejscowienia i zmian w obrębie komórek ludzkich [H6-H9];
- możliwości użycia opracowanych metodyk i poszerzenia zakresu ich stosowalności w:
  - badaniu MNPs zbudowanych z metali, które określane są mianem „problematycznych analitycznie”, a ich efektywne oznaczenie (szczególnie w matrycach fizjologicznych) jest utrudnione [H10];
  - monitorowaniu tworzenia celowanych systemów dostarczania leków zbudowanych z połączeń MNPs z metalolekiem przeciwnowotworowym [H11-H12].

Do zrealizowania powyższych zadań zaproponowałam i zastosowałam techniki oparte na detekcji spektrometrii mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie (ICP-MS, ang. *inductively coupled plasma mass spectrometry*). Spektrometr ten dedykowany jest oznaczaniu izotopów metali z małymi wartościami granic wykrywalności, a w trakcie jednej analizy można oznaczać wiele pierwiastków w szerokim zakresie stężeń i w złożonych matrycach próbek. Detektor ten może pracować w kilku trybach, warunkujących rodzaj otrzymywanej informacji analitycznej: (i) konwencjonalnym – wykorzystywanym do oznaczania całkowitej zawartości pierwiastków w badanej próbce; (ii) analizy pojedynczej

cząstki – stosowanym do charakteryzowania parametrów MNPs; (iii) sprzężonym, gdzie moduł detekcji poprzedzony jest modułem rozdzielania – do analizy form chemicznych pierwiastków w próbkach. W ramach badań przedstawionych w przedmiotowym cyklu publikacji stosowałam (często po raz pierwszy) różne konfiguracje aparaturowe, dzięki którym możliwe było jak najwierniejsze odwzorowanie warunków fizjologicznych podczas prowadzonych doświadczeń, a także wykorzystanie komplementarności otrzymywanych informacji do pełnego i całościowego opisu zmian form chemicznych MNPs o potencjalnym zastosowaniu medycznym.

*Poniżej przedstawiam syntetyczny opis i dyskusję otrzymanych wyników zrealizowanych prac, z uwzględnieniem podziału, dotyczącego poszczególnych obszarów, prowadzących do realizacji obranych celów badawczych.*

#### **4.3.2. Wyniki badań i ich dyskusja**

##### **4.3.2.1. Opracowanie metodyki monitorowania zmian wybranych MNPs w surowicy krwi ludzkiej za pomocą elektroforezy kapilarnej połączonej z ICP-MS [H1-H5]**

Dzięki zaletom MNPs, wynikającym z posiadania ładunku, odpowiednich rozmiarów i kształtu, bogatej chemii powierzchni (funkcjonalizacja, pokrywanie powłoką) a także z dużego pola powierzchni, po ich dożylnym podaniu mogą one kompleksowo i dynamicznie oddziaływać ze składnikami ludzkiej krwi. Składniki te z kolei mogą pełnić kluczową rolę w transporcie, dostarczaniu, pobieraniu i przemianach MNPs w komórkach nowotworowych. Partnerami do tworzenia z nimi połączeń mogą być białka krwi. Uważa się, że to właśnie zdolność do tworzenia tzw. koron białkowych na powierzchni MNPs jest miarą rzeczywistej biodostępności, biodystrybucji, stabilności, a także potencjalnej toksyczności MNPs.

Do badania oddziaływań białka–MNPs stosowano dotychczas najczęściej dichroizm kołowy lub mikroskopię fluorescencyjną, techniki charakteryzujące się małą czułością, często wymagające unieruchomienia MNPs lub posiadania przez nie konkretnych właściwości chemicznych. Nie pozwalają one również monitorować zmian form chemicznych MNPs, powodowanych tworzeniem połączeń z białkami. Z tego względu pomimo około piętnastoletniego badania MNPs jako preparatów potencjalnie zdolnych do migrowania do komórek nowotworowych, wciąż nieznaną była dokładna rola białek krwi w mechanizmie działania tych materiałów. Sytuacja taka stworzyła konieczność opracowania metodyki analitycznej, zapewniającej możliwość ilościowej charakterystyki kinetyki/stechiometrii wiązania oraz powinowactwa różnych MNPs do wybranych białek krwi. Metodyka ta powinna także umożliwiać różnicowanie i rzeczywistą obserwację odrębnych form chemicznych analitów, tzn. niezwiązanych MNPs oraz ich połączeń z białkami, w próbkach o złożonej matrycy.

Do realizacji przedstawionego celu zaproponowałam połączenie elektroforezy kapilarnej (CE, ang. *capillary electrophoresis*) ze specyficznym izotopowo detektorem działającym on-line – ICP-MS.

CE to technika rozdzielania składników ciekłych mieszanin, której mechanizm jest oparty na różnicach w szybkości migracji (naładowanych) indywiduów chemicznych w kapilarze, po przyłożeniu do niej wysokiego napięcia. Ze względu na fakt, że rozdzielanie zachodzi w wąskich kapilarach ze stopionej krzemionki (średnica wewnętrzna 50–100  $\mu\text{m}$ ), technika ta może być stosowana do analizy małych objętościowo próbek (~nL). Poza prostotą i ekonomicznością CE zapewnia skuteczność oraz wydajność analiz, co powoduje, iż znajduje zastosowanie w wielu obszarach badawczych. W dziedzinie nano-analiz, dzięki dużej zdolności rozdzielczej oraz szybkości procesu rozdzielania, używana była dotychczas jako narzędzie do jakościowego charakteryzowania powinowactwa pomiędzy poszczególnymi białkami a NMs. Jej szczególnymi zaletami są: możliwość stosowania elektrolitów rozdzielających (BGE, ang. *background electrolyte*) o składach zgodnych z warunkami fizjologicznymi panującymi w organizmie żywym oraz brak konieczności wykorzystywania rozpuszczalników organicznych.

Dotychczas opublikowane wyniki badań, dotyczących zastosowania CE w charakteryzowaniu oddziaływań białek surowicy krwi z NMs ukierunkowanymi na transport do komórek nowotworowych, odnosiły się głównie do oddzielania NMs otoczonych koronami białkowymi (połączeń NM–białka) od NMs. Badanym białkiem był zwykle wzorzec albuminy z surowicy wołowej (BSA, ang. *bovine serum albumin*). W charakterze detektora używano najczęściej spektrofotometru w zakresie światła nadfioletowego (UV, ang. *ultraviolet*); jest on jednak mało czuły, nie daje możliwości monitorowania istotnych zmian MNPs i nie umożliwia jednoznacznej identyfikacji metalicznego charakteru form analitu. W ramach niniejszego opracowania zaproponowałam zastosowanie po raz pierwszy detekcji ICP-MS. Schematyczną budowę używanego połączenia (tzw. krzyżowego) technik CE z ICP-MS przedstawiłam na **Rysunku 1**.

Połączenie CE-ICP-MS jest w sposób zaawansowany używane w pracach jedynie kilku zespołów badawczych na świecie. Jego efektywna obsługa i otrzymywanie dobrej jakości wyników pomiarów wymaga dużego doświadczenia operatora i specjalistycznych umiejętności typu „know-how”. Według mojej wiedzy, ośrodek badawczy, w którym wykonywałam doświadczenia wchodzące w skład rozprawy habilitacyjnej (Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska) jest jedynym w Polsce, w którym realizowane są tego typu prace.

Obiektami badań realizowanych w ramach rozprawy były trzy rodzaje MNPs:

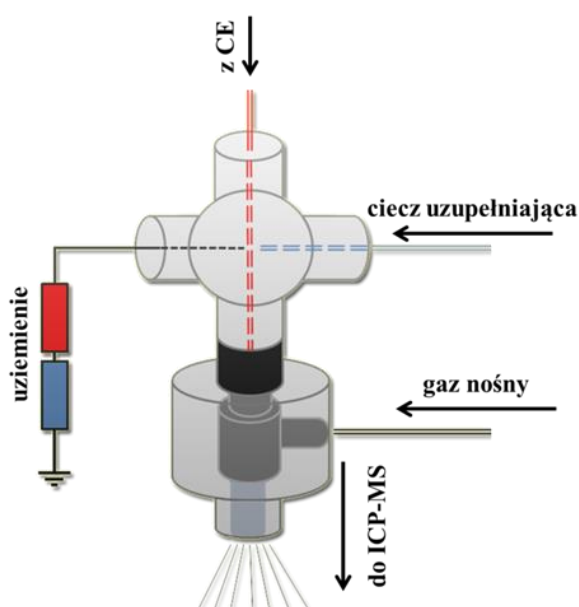
- kuliste nanocząstki złota (AuNPs, ang. *Au nanoparticles*) o średnich rozmiarach rdzenia 5, 10, 20 i 50 nm, stabilizowane kwasem cytrynowym. AuNPs zostały zakupione, a ich charakterystyki dokonał producent;
- nanopręty złota (AuNRs, ang. *Au nanorods*) o średnich rozmiarach  $6 \times 29$  nm, modyfikowane glikolem polietylenowym (PEG, ang. *polyethylene glycol*) i sfunkcjonalizowane jego grupami końcowymi zawierającymi reszty karboksylowe (AuNRs/PEG-COOH) lub aminowe (AuNRs/PEG-NH<sub>2</sub>). AuNRs były syntezowane i charakteryzowane przez dr Federicę Scalletti z grupy



badawczej profesora Luigi'ego Messori (Uniwersytet we Florencji) i przekazane do badań w ramach współpracy między ośrodkami badawczymi;

- półprzewodnikowe kryształy typu rdzeń/płaszcz-funkcjonalizator z rdzeniem wykonanym ze stopu selenku i siarczku kadmu oraz płaszczem z siarczku cynku, sfunkcjonalizowane kwasem 3-merkaptopropionowym (CdSeS/ZnS-MPA) w formie kulistych kropek kwantowych (QDs, ang. *quantum dots*) o rozmiarze 6 nm. QDs zostały zakupione i wstępnie scharakteryzowane przez producenta.

Wybór MNPs podyktowany był licznnością doniesień literaturowych dotyczących ich potencjalnego zastosowania w diagnostyce/terapii/teranostyce chorób nowotworowych na podstawie testów prowadzonych *in vitro/in vivo*.

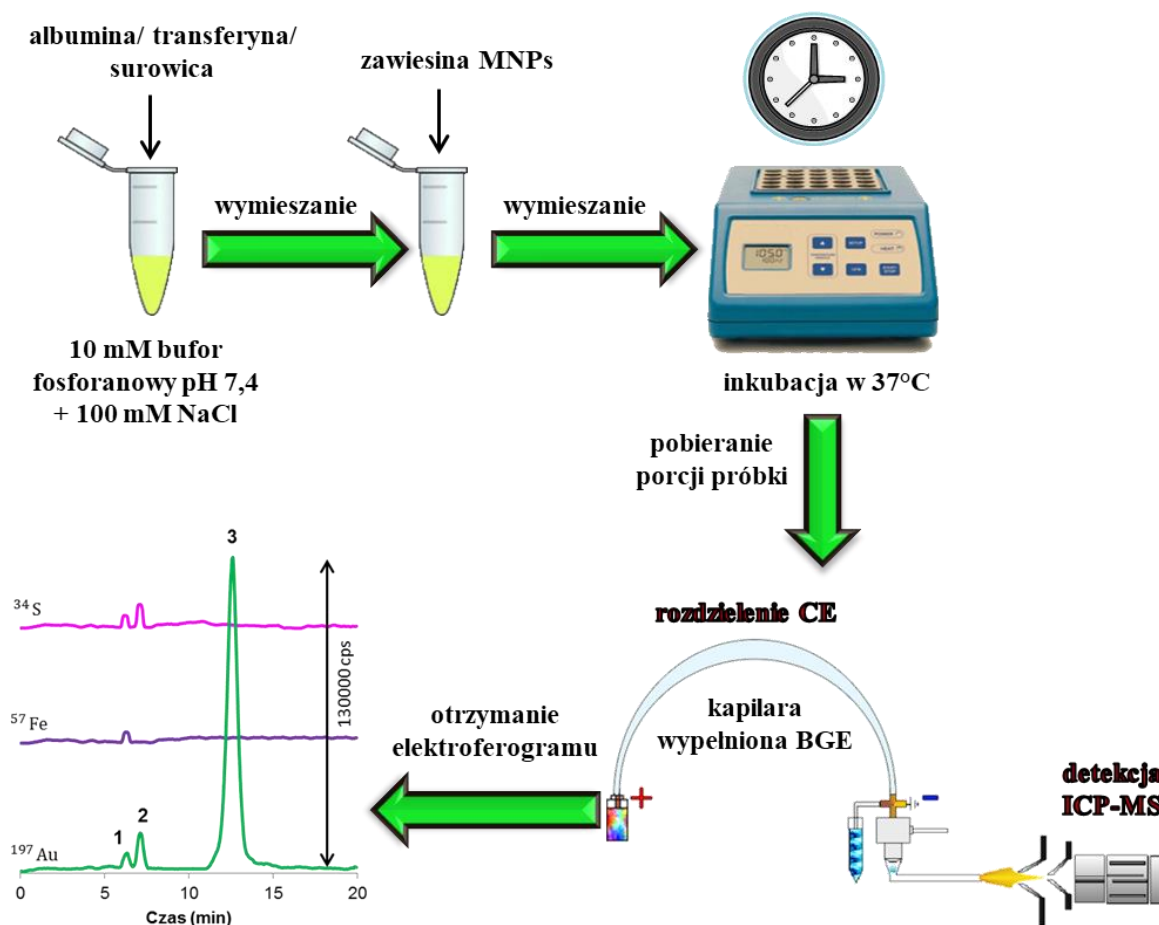


Rys. 1. Budowa połączenia krzyżowego technik CE z ICP-MS

Doświadczenia na tym etapie badań polegały na odpowiednim rozcieńczeniu surowicy krwi ludzkiej lub jej pojedynczych białek transportujących (albuminy, transferyny) w buforze fizjologicznym (10 mM bufor fosforanowy pH 7,4 z dodatkiem 100 mM chlorku sodu) a następnie wymieszaniu z MNPs. Zastosowane stężenia MNPs były w zgodności z danymi literaturowymi dotyczącymi testowania tych/podobnych materiałów *in vivo* na zwierzętach (po przeliczeniu, uwzględniając średnią masę i objętość krwi człowieka; wartości zamieszczono w Tabeli 2). Następnie mieszaniny były inkubowane w temperaturze fizjologicznej (37 °C), a ich reprezentatywne części pobierane systematycznie podczas trwania doświadczenia i analizowane za pomocą CE-ICP-MS. Schemat obrazujący przygotowanie próbek do badań przedstawiono na Rysunku 2. Badaniom poddano także MNPs niepołączone z białkami, pomijając etap dodawania białek/surowicy.

Po raz pierwszy zastosowano CE-ICP-MS do badania oddziaływań AuNPs z białkami ludzkimi: albuminą (HSA, ang. *human serum albumin*) i transferyną (Tf), a następnie

ich zmian w surowicy krwi ludzkiej [H1]. Publikację, opisującą przeprowadzone doświadczenia, czasopismo *Metallomics* zakwalifikowało do prestiżowej grupy *Hot papers*. Parametrami różnicującymi przebieg tworzenia koron białkowych na powierzchni AuNPs były: rozmiar cząstek oraz czas interakcji indywidualów chemicznych. Następnie przedstawiono model matematycznego charakteryzowania stechiometrii oddziaływań białka–AuNP oparty na porównaniu pól powierzchni sygnałów  $^{197}\text{Au}^+$  (marker obecności AuNPs) i  $^{34}\text{S}^+$  (marker obecności białka) [H2]. W kolejnym etapie prac zweryfikowano stosowalność opracowanej metodyki do efektywnego badania zmian MNPs typu rdzeń/płaszcz, zbudowanych z innych niż AuNPs pierwiastków – QDs ( $^{111}\text{Cd}$  – marker rdzenia,  $^{66}\text{Zn}$  – marker płaszcza) w surowicy krwi ludzkiej [H3]. Tym razem parametrami różnicującymi przebieg zmian były: dawka QDs oraz czas oddziaływania partnerów reakcji. Opracowano również metodykę badania zmian AuNRs w surowicy, biorąc pod uwagę wpływ kształtu MNPs (w porównaniu do AuNPs), obecności odmiennych końcowych grup funkcjonalizujących (-COOH vs. -NH<sub>2</sub>) oraz czasu prowadzenia doświadczeń [H4] na powinowactwo względem białek surowicznych. Otrzymane wyniki zebrano w formie publikacji przeglądowej, w której porównano je z innymi dotychczasowymi zastosowaniami CE w badaniu reakcji typu nano-bio i wykazano ich analityczną przewagę [H5].



Rys. 2. Przygotowanie próbek do badań, dotyczących charakteryzowania oddziaływań białka surowicy–MNPs

Pierwszym celem badawczym było zoptymalizowanie parametrów rozdzielania elektroforetycznego i detekcji ICP-MS, zapewniając maksymalną rozdzielczość i czułość opracowanych metod pozwalających na efektywne i ilościowe rozróżnienie form chemicznych wybranych MNPs przed i po oddziaływaniu z białkami surowicy krwi ludzkiej [H1, H3, H4]. Jednym z najważniejszych czynników wpływających na jakość rozdzielania elektroforetycznego jest rodzaj stosowanego BGE, jego stężenie i pH. Podstawowym problemem w badaniu obiektów nanometrycznych za pomocą CE (a szczególnie jako połączeń z białkami) może być ograniczony odzysk analitu z kapilary rozdzielającej (% rzeczywistego stężenia analitu opuszczający kapilarę CE). Dobór BGE był zatem uwarunkowany rozdzielczością metody i wartością tego parametru. Wybór rodzaju związku stosowanego w buforze pracującym był dodatkowo zawężony do tych, których pK jest zbliżone do 7,4 (tak by pH, utworzonego z ich zastosowaniem buforu, było tożsame z tym obserwowanym w krwi ludzkiej), a prąd generowany z ich użyciem przy napięciu maksymalnie +25 kV nie przekraczał 50  $\mu$ A (co jest górną granicą technicznej stosowalności połączenia CE z ICP-MS). Ze względu na konieczność utrzymania zgodności składu BGE z warunkami panującymi w surowicy krwi ludzkiej nie stosowano związków powierzchniowo czynnych jako dodatków do BGE.

Opracowano trzy oryginalne metodyki analityczne (dla AuNPs, AuNRs i QDs) zapewniające efektywną analizę zmian wybranych MNPs w surowicy krwi ludzkiej. Optymalne parametry rozdzielania i detekcji, a także parametry analityczne metod, przedstawiono w **Tabeli 2**. W każdym przypadku optymalnymi były bufony biologiczne z grupy Gooda (ang. *Good's buffers*) – kwas 4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazynoetanosulfonowy (HEPES) lub kwas piperazyno-1,4-bis(2-etanosulfonowy) (PIPES), których pH (7,4) ustawiano z użyciem roztworu wodorotlenku sodu. Bufory te charakteryzują się dużą ruchliwością elektroforetyczną, przy małych wartościach generowanych natężeń prądu (do 20  $\mu$ A). Do osiągnięcia prawidłowej rozdzielczości nie było konieczne stosowanie związków powierzchniowo czynnych (co sugerowano we wcześniejszych doniesieniach literaturowych jako niezbędne w badaniu zmian MNPs), a otrzymane odzyski analitu i granice wykrywalności (nawet w matrycach zawierających białka) były lepsze niż w przypadku innych metod stosowanych do oznaczania MNPs opartych na rozdzielaniu elektroforetycznym. Powtarzalność i odtwarzalność czasów migracji i pól powierzchni świadczyły o dużej precyzji wyników pomiarów. Główne różnice wartości parametrów metod dla AuNPs i AuNRs wynikały z różnego rozmiaru lub odmiennej funkcjonalizacji ich powierzchni.

Kolejnym celem badawczym, było scharakteryzowanie przebiegu zmian MNPs w obecności białek transportujących krwi (pojedynczo lub w surowicy krwi ludzkiej) oraz wytypowanie parametrów MNPs i sposobu prowadzenia doświadczeń, mających kluczowe znaczenie dla zmian ich powinowactwa względem poszczególnych białek [H1, H2, H3, H4].

**Tabela 2** Zestawienie optymalnych parametrów rozdzielania i detekcji form chemicznych MNPs w surowicy krwi ludzkiej za pomocą CE-ICP-MS, wraz z otrzymanymi parametrami analitycznymi metod

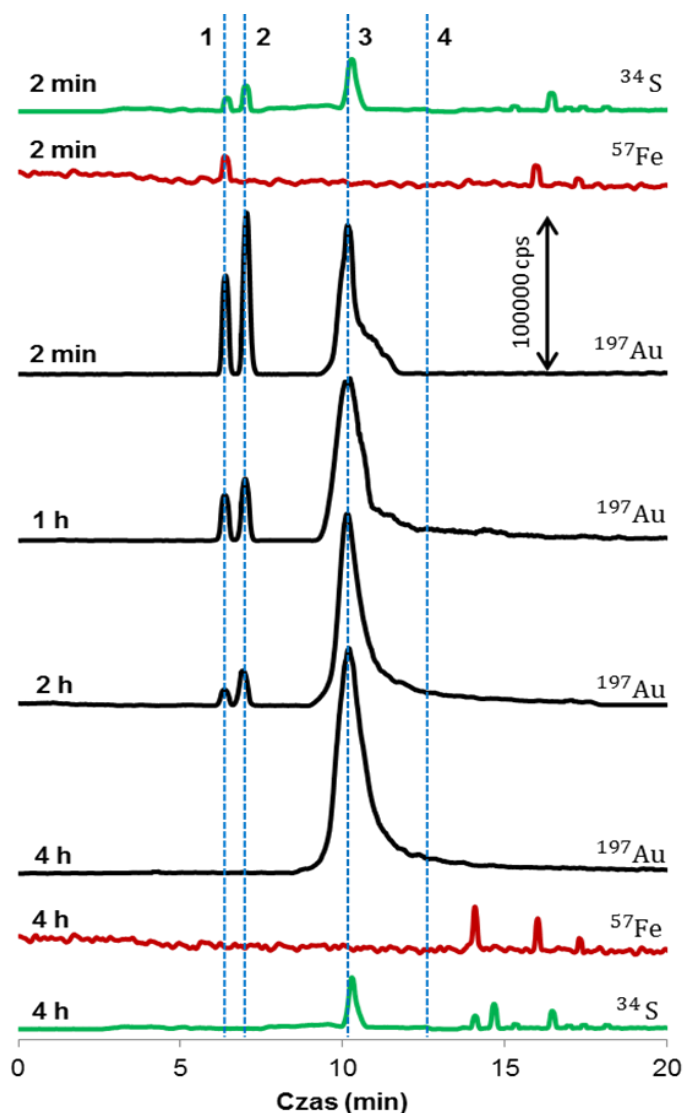
<i>parametr</i>	<b>AuNPs</b>	<b>AuNRs</b>	<b>QDs</b>
<i>kapilara rozdzielająca</i>	ze stopionej krzemionki, ID 75 $\mu\text{m}$ , OD 375 $\mu\text{m}$ , długość 70 cm		
<i>monitorowane izotopy</i>	$^{197}\text{Au}$ , $^{57}\text{Fe}$ , $^{34}\text{S}$ , $^{72}\text{Ge}^{\text{a}}$	$^{197}\text{Au}$ , $^{72}\text{Ge}^{\text{a}}$	$^{111}\text{Cd}$ , $^{66}\text{Zn}$ , $^{57}\text{Fe}$ , $^{72}\text{Ge}^{\text{a}}$
<i>BGE</i>	40 mM HEPES, pH 7,4	10 mM PIPES, pH 7,4	20 mM HEPES, pH 7,4
<i>przyłożone napięcie [kV]</i>	+ 15	+12 (-COOH)/ +20 (-NH <sub>2</sub> )	+ 15
<i>dozowanie próbki [mbar×s]</i>	20×5	20×5	50×6
<i>testowane stężenia MNPs [mg L<sup>-1</sup>]</i>	9,5–19,0	1,7–4,3	0,07–0,14
<i>średni odzysk z kapilary [%]<sup>bc</sup></i>	86–97	91–99	94
<i>powtarzalność <math>t_m</math> [%]<sup>d</sup></i>	1,0–4,1	4,7–5,2	4,7
<i>odtworzalność <math>t_m</math> [%]<sup>b</sup></i>	2,1–6,4	7,9–8,2	6,8
<i>powtarzalność <math>P_p</math> [%]<sup>d</sup></i>	2,4–4,9	5,1–5,6	6,4
<i>odtworzalność <math>P_p</math> [%]<sup>b</sup></i>	4,0–6,9	6,1–6,3	7,9
<i>LOD [<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>]</i>	8,3–9,9	5,5–5,7	0,8

a – wzorzec wewnętrzny; b –  $n = 3$ ; c – w matrycy zawierającej białko, d –  $n = 6$ ; ID – średnica wewnętrzna; OD – średnica zewnętrzna;  $t_m$  – czas migracji;  $P_p$  – pole powierzchni sygnału; LOD – granica wykrywalności

- *Charakterystyka zmian AuNPs w obecności białek transportujących krwi [H1, H2]*

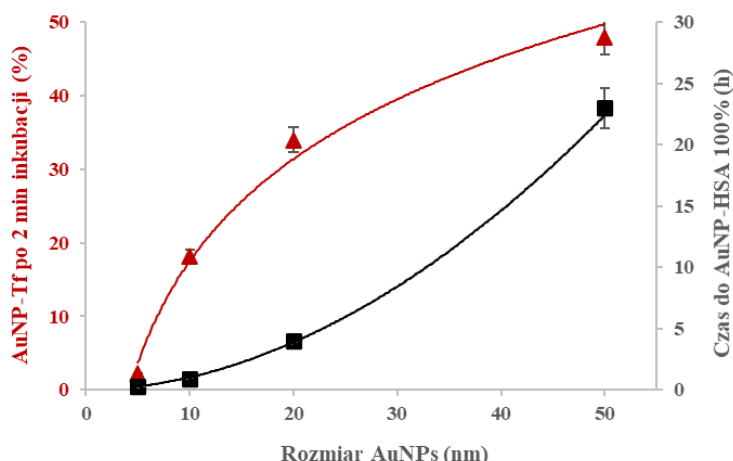
W badaniu połączeń AuNPs z białkami surowiczymi stężenie nanomateriału dobrano przeliczając dawki AuNPs stosowane pomyślnie w radioterapii guzów u myszy na rozmiary organizmu ludzkiego. Zbadano możliwość otaczania MNPs koronami zbudowanymi z surowiczego białka transportującego obecnego we krwi w największym stężeniu – HSA. Zaobserwowano, że tworzenie połączeń z HSA następuje szybko.

W przypadku AuNPs o rozmiarach 10–50 nm zostały one całkowicie otoczone koroną HSA (brak sygnału pochodzącego od „wolnych” MNPs na elektroferogramie) natychmiast po wymieszaniu reagentów, natomiast dla 5 nm – tworzenie połączeń było wolniejsze (50 min). W przypadku Tf – białka transportującego żelazo w organizmie ludzkim, zaobserwowano tworzenie dwóch rodzajów koron białkowych, odpowiadających połączeniom z dwoma fizjologicznie występującymi formami białka: holo-transferyną (hTf, forma nasycona żelazem – 30% w/w) i apo-transferyną (aTf, forma wolna od żelaza – 70% w/w).



**Rys. 3.** Zmiany form chemicznych 20 nm AuNPs w surowicy krwi ludzkiej monitorowane za pomocą CE-ICP-MS; sygnały: 1 – AuNP-hTf, 2 – AuNP-aTf, 3 – AuNP-HSA, 4 – „wolne” AuNPs [H1]

Odmienne niż w przypadku HSA w tworzeniu połączeń z Tf brało udział maksymalnie 10% MNPs (dla AuNPs o rozmiarze 50 nm). W mieszaninach AuNPs z immunoglobuliną G nie zaobserwowano tworzenia koron białkowych (nawet po 24 h inkubacji) na powierzchni MNPs (na elektroferogramie występował sygnał jedynie od postaci „wolnej” MNPs). W przypadku fizjologicznej mieszaniny HSA i Tf (w stosunku molowym 15:1) AuNPs otaczane były jedynie koroną z HSA (niezależnie od rozmiaru MNPs). Wynik ten sugerował spodziewaną dominującą rolę tego białka w procesach zmian form chemicznych AuNPs w surowicy krwi ludzkiej. Jednak doświadczenia przeprowadzone w jej środowisku potwierdziły znaczący udział Tf w procesach tworzenia koron białkowych na powierzchni AuNPs, na co wpływ może mieć złożona matryca badanej próbki. Zmiany rejestrowanych form chemicznych AuNPs (20 nm) w surowicy krwi ludzkiej w czasie doświadczenia zaprezentowano na **Rysunku 3**. Udział procentowy połączeń AuNP-Tf na początku doświadczenia był tym większy im większy rozmiar MNPs zastosowano (**Rysunek 4**, linia czerwona).



**Rys. 4.** Wpływ rozmiaru AuNPs na charakterystykę ich oddziaływań z Tf

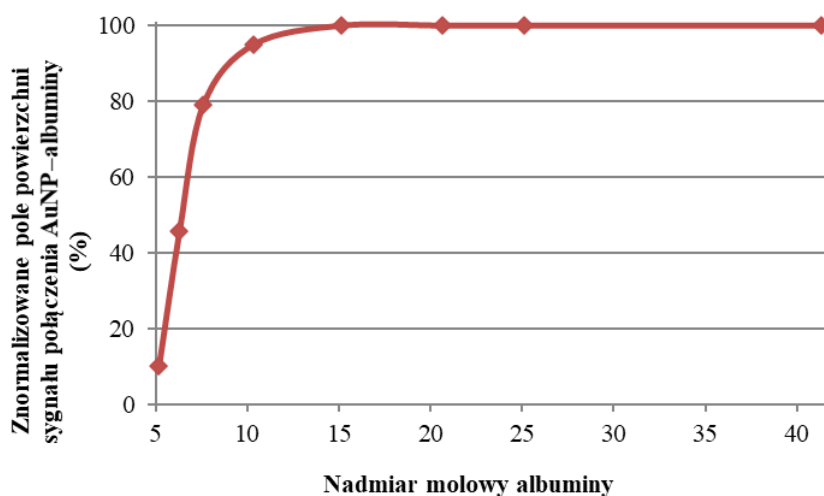
W trakcie inkubacji próbki w temperaturze fizjologicznej obserwowano stopniowy rozpad połączeń z Tf (zmniejszające się pole powierzchni sygnału) na korzyść zwiększającego się udziału formy AuNPs połączonej z HSA (**Rysunek 3**), przy czym wraz ze zwiększaniem rozmiaru użytych AuNPs zmiany składu korony zachodziły wolniej.

Wyniki przeprowadzonych badań mogą mieć istotne znaczenie przy projektowaniu terapii przeciwnowotworowych z użyciem transportu celowanego, gdyż receptory Tf (TfR) są nadprodukowane w błonach komórek nowotworowych (100 razy vs. komórki prawidłowe). NMs o większym powinowactwie do Tf i dłuższym czasie cyrkulacji połączenia z tym białkiem, mogą być transportowane selektywnie z wykorzystaniem ścieżki aktywnego transportu żelaza do wnętrza komórek zmienionych nowotworowo.

Ze względu na zaobserwowane w poprzednim etapie badań wolniejsze tworzenie połączeń AuNPs o rozmiarze 5 nm z HSA sprawdzono wpływ dawki MNPs na kinetykę tworzenia tego typu koron [**H2**]. Zastosowano osiem różnych stężeń nanomateriału, dla których nadmiar molowy białka względem MNPs zawierał się w przedziale od 5 do 45. W przypadku nadmiaru mniejszego niż 15, część AuNPs (nawet po 24 h reakcji) występowała w dalszym ciągu w formie „wolnej”, przy czym pole sygnału pochodzącego od niepołączonych z białkiem MNPs zmniejszało się wraz ze zwiększaniem nadmiaru molowego HSA w mieszaninie. Gdy nadmiar ten był większy niż 15, proces otaczania MNPs koroną białkową zachodził do końca, a w mieszaninie nie były obecne „wolne” formy AuNPs. Opisane zależności przedstawiono na **Rysunku 5**.

Wyznaczenie stechiometrii tworzenia połączeń AuNPs o większych rozmiarach z HSA okazało się znacznie trudniejszym zadaniem ze względu na dużą szybkość zachodzących reakcji i brak możliwości obserwacji izotopu  $^{34}\text{S}$ , z nieprzereagowanych form białka przy użyciu jedynie ICP-MS z pojedynczym analizatorem kwadrupolowym. Rozwiązaniem okazało się zastosowanie matematycznej interpretacji wyników (pól powierzchni sygnałów analitów), która pozwoliła na wyliczenie stechiometrii reakcji AuNP-HSA w surowicy krwi ludzkiej po ustaleniu równowagi reakcji [**H2**]. Ustalono, że w zależności od rozmiaru

nanomateriału liczba przyłączonych cząsteczek białka do jednej NPs ulega zmianie (od 46 – dla 10 nm, do 292 – dla 50 nm) i nie jest wprost proporcjonalna do zwiększającej się powierzchni właściwej AuNPs.



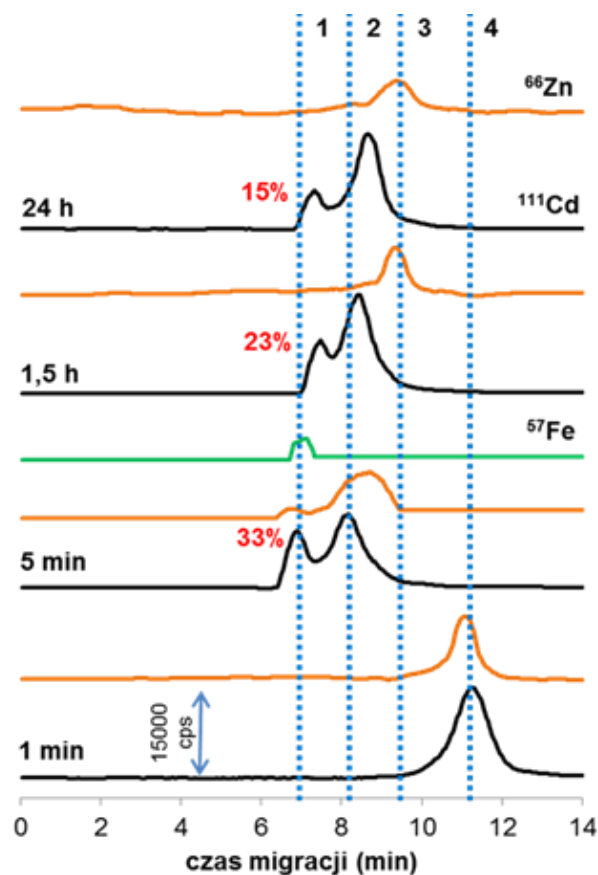
Rys. 5. Zależność znormalizowanego pola powierzchni sygnału połączenia AuNP-HSA od nadmiaru molowego użytej HSA [H2]

Badania wykonywano w ramach projektu *Preludium Narodowego Centrum Nauki (2013/11/N/ST4/01480)*, którego byłam kierownikiem w latach 2014 – 2015.

- Charakterystyka zmian QDs w obecności białek transportujących krwi [H3, H5]

W badaniach zastosowano cztery dawki QDs (5,85 – 11,70  $\mu\text{mol Cd}$  na litr krwi), kierując się uprzednimi doniesieniami literaturowymi, dotyczącymi testów *in vitro* efektywnego dostarczania QDs CdSeS/ZnS-MPA do komórek nowotworowych.

Bez względu na wielkość dawki QDs w mieszaninach z HSA obserwowano stopniowe otaczanie QDs koronami białkowymi (w każdym z przypadków kończące się po około 1 h inkubacji badanej próbki w temperaturze 37 °C). Powstałe połączenia były trwałe nawet po 20 h prowadzenia doświadczenia. Podczas badań nie zaobserwowano odrywania otoczki ZnS od rdzenia kadmowego. W przypadku oddziaływań QDs z Tf już na początku inkubacji (niezależnie od użytej dawki) MNPs nie występowały w formie „wolnej”, a w postaci dwóch rodzajów połączeń: z hTf i aTf. Wielkość pola powierzchni sygnałów po 5 min doświadczenia potwierdzała występowanie połączeń QDs z Tf w dwóch formach w ilościach odpowiadających ich fizjologicznemu stosunkowi; w miarę upływu czasu obserwowano zmniejszanie się ilości formy QD-hTf i zwiększanie tej z aTf (**Rysunek 6**). Procesowi temu towarzyszyło oddzielanie się otoczki ZnS od rdzenia kadmowego kropek, którego szybkość była uzależniona od dawki użytego nanomateriału (im większa dawka tym reakcja wolniejsza; dla dawki 5,85  $\mu\text{mol L}^{-1}$  Cd – 5 min; 11,70  $\mu\text{mol L}^{-1}$  Cd – 5 h). Zjawisko to ma istotne znaczenie dla potencjalnych zastosowań medycznych QDs, gdyż otoczka ZnS zapobiega uwalnianiu się toksycznych form kadmu z rdzenia.



**Rys. 6.** Elektroferogramy CE-ICP-MS składników mieszanin Tf (stężenie białka  $0,3 \text{ g L}^{-1}$ ; symulujące 10-krotnie rozcieńczoną surowicę) z QDs (stężenie Cd  $0,877 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ) po zmiennym czasie inkubacji; sygnały: 1 – QD–hTf, 2 – QD–aTf, 3 – sygnał cynku obecny w oddzielonej od rdzenia otoczce ZnS, 4 – „wolne” QDs [H3]

Zbadano zachowanie się mieszaniny HSA i Tf (15:1) inkubowanej z QDs i stwierdzono, że wielkość użytej dawki MNPs nie ma wpływu na wyniki. Do około 30 min inkubacji mieszaniny sygnał „wolnych” QDs zmniejszał się stopniowo i tworzyły się połączenia z białkami – w 95% kropki reagowały z HSA, zaś w 5% z hTf. Otrzymane korony były trwałe nawet po 24 h doświadczenia. Nie zanotowano odłączania otoczki ZnS od rdzenia QDs, co sugeruje ochronny wpływ dużego udziału koron HSA na ten proces [H3].

Następnie zbadano przemiany QDs w surowicy krwi ludzkiej. Otrzymane wyniki były inne niż w przypadku fizjologicznej mieszaniny białek HSA i Tf. Zaobserwowano, że w próbce (niezależnie od dawki QDs oraz czasu inkubacji) nie następuje tworzenie koron białkowych na powierzchni QDs; stwierdzono natomiast odłączanie się otoczki ZnS od rdzenia kropek, przy czym czas jej oderwania wydłużał się wraz ze zwiększającą się dawką nanomateriału (od 2 min dla dawki  $5,85 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  Cd do 2,5 h dla  $11,70 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  Cd). W celu wyjaśnienia przyczyn braku oddziaływań pomiędzy QDs a głównymi białkami transportującymi, próbkę surowicy krwi ludzkiej podzielono na frakcję małocząsteczkową ( $< 10 \text{ kDa}$ ) i wielkocząsteczkową ( $> 10 \text{ kDa}$ ) za pomocą ultrasączenia, a następnie każdą z frakcji inkubowano z QDs. Stwierdzono, że z otoczką ZnS łączyły się białka surowicze inne niż HSA i Tf i to one powodowały jej oderwanie, natomiast QDs bez otoczki oddziaływały z małocząsteczkowymi składnikami surowicy [H3]. Opracowaną metodykę i otrzymane dane



porównano z wcześniejszymi doniesieniami, dotyczącymi badania oddziaływań QDs z białkami i biocząsteczkami, wykazując nowe aspekty zaproponowanych przez mnie rozwiązań [H5].

Ponadto, przedstawione wyniki mogą stanowić podstawę projektowania terapii przeciwnowotworowych z zastosowaniem QDs, gdyż dobór odpowiedniej dawki MNPs może pozwalać ustalać optymalny czas oderwania otoczki ZnS, utrzymujący toksyczność materiału na akceptowalnym poziomie już na etapie transportu w układzie krwionośnym.

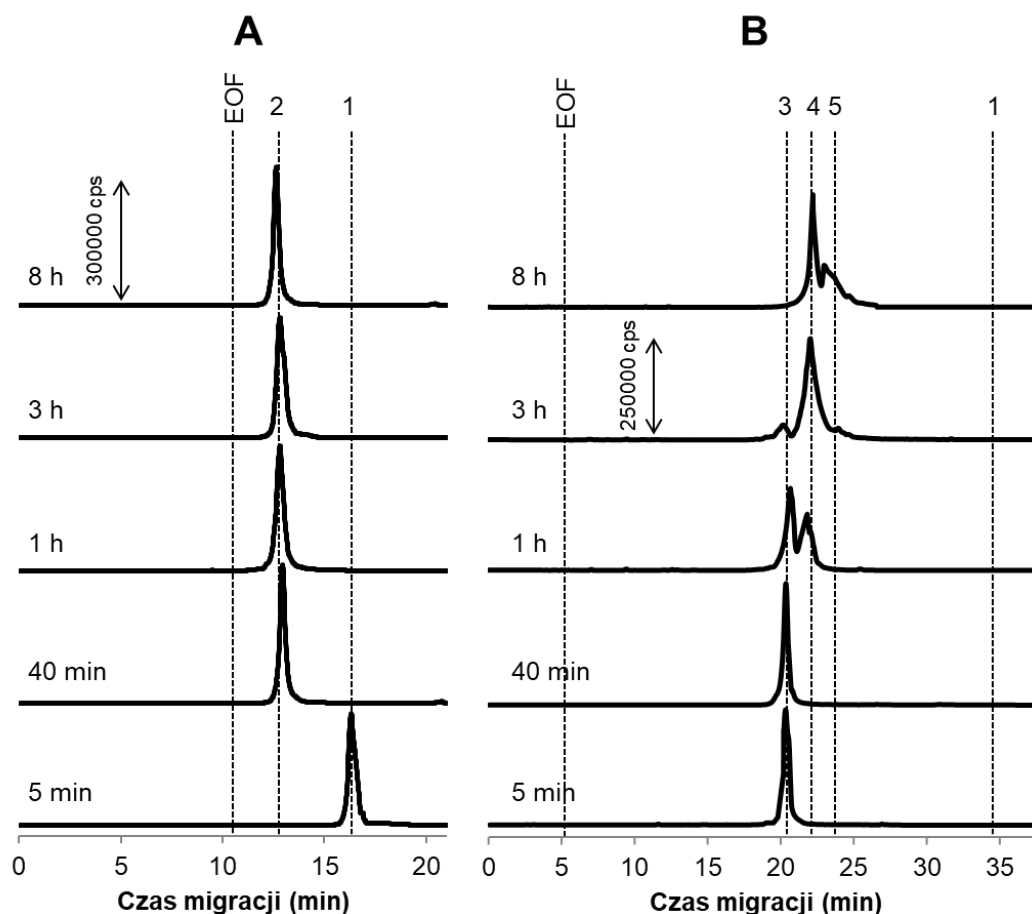
*Badania wykonywano w ramach projektu Preludium Narodowego Centrum Nauki (2013/11/N/ST4/01480), którego byłam kierownikiem w latach 2014 – 2015.*

- *Charakterystyka zmian AuNRs w surowicy krwi ludzkiej [H4]*

W porównaniu do AuNPs nanopręty złota (AuNRs) wykazują lepszą charakterystykę transformowania energii (pożądaną cechą np. w terapiach z użyciem wiązki laserowej) przy stosowaniu znacznie mniejszej dawki (**Tabela 2**). W ramach badania ich właściwości istotnym kierunkiem było jak dotąd charakteryzowanie wpływu modyfikacji/funkcjonalizacji powierzchni AuNRs na ich dystrybucję w poszczególnych organach i toksyczność. Jak dotąd, nie ustalono jednak, w jaki sposób zmiany w budowie części składowych MNPs wpływają na ich powinowactwo względem białek ludzkiej krwi. Nie zaproponowano także metodyki, dzięki której monitorować będzie można poszczególne formy chemiczne materiału.

W ramach badań wchodzących w skład rozprawy potwierdzono tworzenie połączeń pomiędzy dwoma rodzajami AuNRs (z grupami funkcyjnymi  $-NH_2$  lub  $-COOH$ ) a pojedynczymi białkami transportującymi: HSA i Tf. Pomimo że w obu przypadkach stan równowagi reakcji tworzenia koron ustalał się szybko ( $< 5$  min), to udział AuNRs/PEG- $NH_2$  otoczonych koroną z HSA był około 5 razy większy (względem MNPs „wolnych”) niż w przypadku AuNRs/PEG- $COOH$ . Z kolei w surowicy krwi ludzkiej AuNRs/PEG- $COOH$  w czasie krótszym niż 40 min otoczone były koroną z aTf, podczas gdy (w tym samym czasie inkubacji) partnerem oddziaływań AuNRs/PEG- $NH_2$  była HSA. Dalszy przebieg zmian form chemicznych dwóch MNPs w czasie inkubacji także był odmienny. Podczas gdy grupy  $-COOH$  stabilizowały oddziaływanie z aTf (trwałe nawet po 8 h), połączenie AuNRs/PEG- $NH_2$  z HSA ulegało rozpadowi po 3 h, a w tworzenie koron po tym czasie zaangażowane były inne (najprawdopodobniej mniejsze niż HSA) białka surowicze. Przebieg zmian form chemicznych dwóch rodzajów AuNRs w surowicy krwi ludzkiej przedstawiono na **Rysunku 7**.

Powyższe badania wykazały istotny wpływ chemii powierzchni MNPs na ich zmiany w surowicy krwi ludzkiej. Potwierdzono, że nie tylko rozmiary i dawki NMs mogą determinować ich ścieżki metaboliczne i transportowe *in vivo*. Dowiedziono, że podczas projektowania MNPs jako narzędzi diagnostycznych/terapeutycznych kluczowym czynnikiem podlegającym kontroli i optymalizacji powinien być rodzaj modyfikacji/funkcjonalizacji powierzchni.



**Rys. 7.** Elektroferogramy  $^{197}\text{Au}$  składników mieszaniny 30-krotnie rozcieńczonej surowicy krwi ludzkiej zawierającej (A) - AuNRs/PEG-COOH lub (B) - AuNRs/PEG-NH<sub>2</sub> (4.3 mg L<sup>-1</sup> Au) po zmiennym czasie inkubacji; sygnały: 1 – „wolne” AuNRs, 2 – połączenie AuNR-aTf, 3 – połączenie AuNR-HSA, 4,5 – połączenia AuNRs z innymi białkami [H4]

*Badania były częścią projektu Opus Narodowego Centrum Nauki (2015/17/B/ST4/03707) i wykonywane były w ramach mojego stażu podoktorskiego.*

**4.3.2.2.** Zaproponowanie platformy analitycznej do badania pobierania, umiejscowienia i zmian AuNPs w komórkach ludzkich z zastosowaniem komplementarnych technik z detekcją ICP-MS [H6-H9]

Dotychczas nie zaproponowano efektywnego postępowania do ilościowego badania stopnia akumulacji MNPs i zmian form chemicznych w komórkach ludzkich. Nie została także poznana rola związków wielko- i małowcząsteczkowych wchodzących w skład cytozolu komórkowego w tych procesach. Większość dotychczasowych doniesień literaturowych, dotyczących komórkowych testów *in vitro*, miała na celu obrazowanie rozmieszczenia MNPs w komórkach lub tkankach nowotworowych po ich wcześniejszym pobraniu, a także określanie ich potencjalnej cytotoksyczności. W tym obszarze technikami dominującymi są mikroskopia: fluorescencyjna oraz elektronowa transmisyjna, które dostarczają informacji analitycznych na poziomie co najwyżej półilościowym. W prowadzonych badaniach zwykle

nie uwzględniano faktu, że po dożylnym podaniu MNPs tworzą połączenia z białkami transportującymi krwi, co uniemożliwia pobieranie NMs do komórek w „wolnej” i niezmienionej fizjologicznie formie. Przedstawianym metodom często brakowało również dostatecznej charakterystyki jakości otrzymywanych wyników i określenia dokładności oznaczeń analizów.

Zaproponowałam zbudowanie kompleksowej platformy składającej się z wielu narzędzi badawczych jako komplementarnych źródeł informacji bioanalitycznej oferującej postępowania charakteryzujące się zgodnością warunków prowadzenia symulacji *in vitro* z fizjologicznymi. Obiektem badań w tej części rozprawy były AuNPs o czterech rozmiarach (5, 10, 20, 50 nm), a prace realizowano w trzech etapach:

- (i) analiza przeprowadzonych dotychczas badań i opracowanie nowego podejścia w oznaczaniu stopnia pobierania AuNPs do komórek ludzkich za pomocą ICP-MS [H6, H7];
- (ii) sprawdzenie stosowalności techniki CE-ICP-MS do badania zmian form chemicznych AuNPs w matrycy cytozolu ludzkiego [H8];
- (iii) opracowanie zaawansowanej metodyki do badania umiejscowienia AuNPs w przedziałach komórkowych i charakteryzowania ich form chemicznych, za pomocą technik opartych na detekcji ICP-MS [H9].

*Badania były częścią projektu Opus Narodowego Centrum Nauki (2015/17/B/ST4/03707), w którym pełniłam rolę wykonawcy.*

- *Badanie stopnia pobierania AuNPs do komórek ludzkich [H6, H7]*

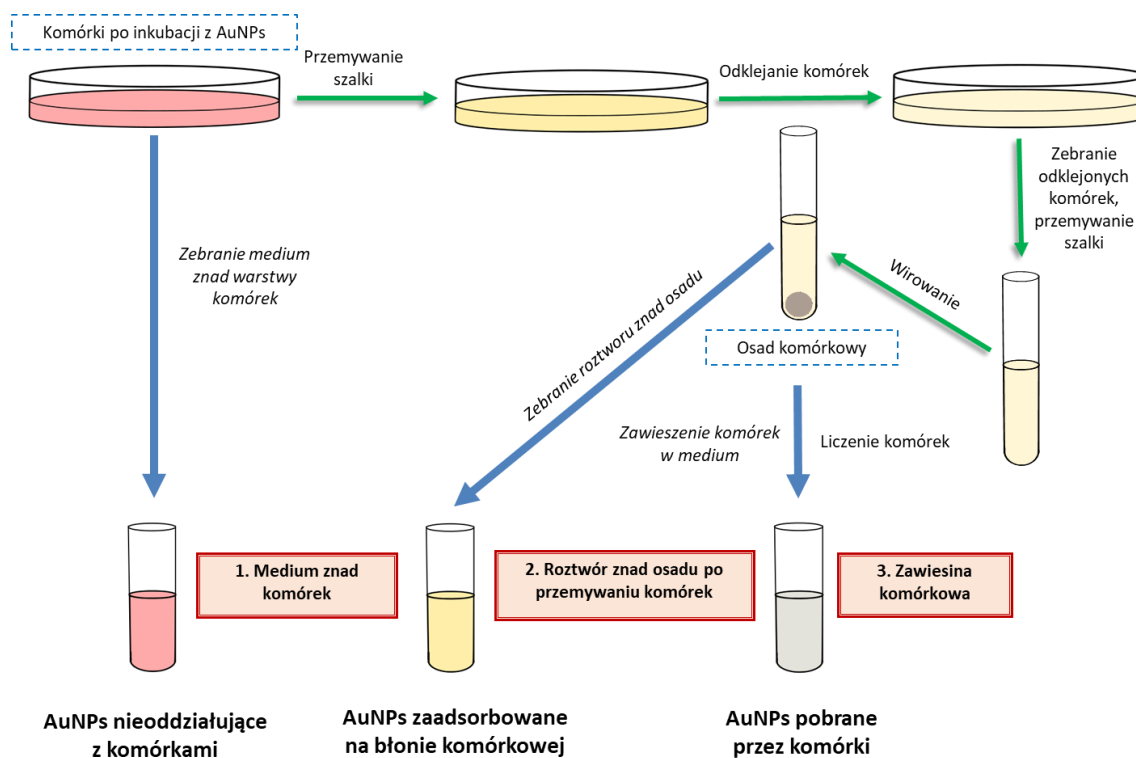
Celem badań było zaprojektowanie postępowania analitycznego służącego do oznaczania za pomocą ICP-MS stopnia pobierania AuNPs (wraz z bilansem masy analitu) przez komórki w warunkach imitujących wnikanie materiałów *in vivo*.

Dokonanie wstępnego przeglądu literatury w zakresie technik analitycznych stosowanych do badania stopnia pobierania AuNPs do komórek, pozwoliło ocenić, że w większości istniejących metodyk do analizy ilościowej zastosowanie znajdowała technika ICP-MS, a przygotowanie próbek realizowano głównie poprzez wspomagane mikrofalami roztwarzanie badanego materiału w wodzie królewskiej [H6]. W ramach rozprawy zastosowano analogiczne etapy postępowania, ale także podjęto się następujących modyfikacji i udoskonalień [H7]:

- (i) postępowanie wzbogacono o pre-inkubację AuNPs w roztworze surowicy krwi ludzkiej w celu wytworzenia korony białkowej na powierzchni NMs. Dzięki temu możliwe było stworzenie warunków pobierania MNPs przez komórki, które były zbliżone do środowiska organizmu ludzkiego;
- (ii) zoptymalizowano sposób prowadzenia testów pobierania i przygotowania próbek z uwzględnieniem nie tylko frakcji pobranych do komórek AuNPs, ale także zaadsorbowanych na ich powierzchni (luźno związanych z zewnętrzną stroną błony komórkowej; **Rysunek 8**).

Umożliwiło to uzyskanie nie tylko informacji ilościowych, ale także istotnych ze względu na określenie mechanizmu pobierania AuNPs;

- (iii) opracowano algorytm obliczania stopnia pobierania nanomateriału, po uwzględnieniu gęstości komórek i zawartości analitu w materiale kontrolnym. Prowadzono także (po raz pierwszy) bilans masy analitu, dzięki któremu możliwa była ocena dokładności uzyskiwanych wyników.



Rys. 8. Przygotowywanie komplementarnych frakcji do analiz ICP-MS po testach pobierania AuNPs

We wszystkich doświadczeniach materiał badawczy stanowiły komórki gruczolakoraka piersi linii MCF-7 lub prawidłowe komórki nabłonkowe piersi MCF-10a po testach pobierania AuNPs. Hodowle komórkowe oraz testy pobierania były prowadzone we współpracy z Katedrą Biotechnologii Medycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej.

Sprawdzono wpływ rozmiaru nanocząstek złota (5, 10, 20, 50 nm), rodzaju komórek (nowotworowe lub prawidłowe), obecności otoczki białkowej oraz czasu inkubacji na stopień pobierania AuNPs przez komórki. Największy stopień pobierania przez komórki nowotworowe (MCF-7) zaobserwowano dla AuNPs o średnicach 20 nm oraz 50 nm, co może potwierdzać postulowane w literaturze założenie efektywniejszego transportu MNPs o większych rozmiarach dzięki efektowi EPR. Dane literaturowe sugerują również dwustopniowy charakter procesu pobierania MNPs przez komórki - w pierwszym etapie MNPs ulegają adsorpcji na powierzchni błony komórkowej, a w drugim zostają pobrane do wnętrza komórek. Hipoteza ta znalazła potwierdzenie w przeprowadzonych badaniach, gdyż obserwowano obecność AuNPs luźno związanych z błoną komórkową (frakcja nr 2).

Porównano pobieranie AuNPs przez komórki nowotworowe i prawidłowe (MCF-7 vs. MCF-10a). Zaobserwowano, że średni stopień pobierania MNPs (pre-inkubowanych w surowicy krwi ludzkiej przez 45 min) przez komórki prawidłowe jest mniejszy niż przez komórki MCF-7, co może świadczyć o zwiększonej preferencji i uprzywilejowanym transporcie MNPs do komórek nowotworowych. Przeprowadzono również doświadczenia, w których w postępowaniu analitycznym został pominięty etap pre-inkubacji AuNPs w surowicy krwi ludzkiej.

Uzyskane wyniki potwierdzają, że białka surowicy pokrywające powierzchnię AuNPs zmniejszają ich zdolność do wnikania do wnętrza komórki. Zjawisko to powinno być brane pod uwagę podczas planowania dawkowania w terapiach/testach klinicznych z zastosowaniem AuNPs, a etap pre-inkubacji NMs w surowicy krwi ludzkiej nie powinien być pomijany podczas prowadzenia badań *in vitro*.

- *CE-ICP-MS jako technika badania zmian form chemicznych AuNPs w cytozolu ludzkim [H8]*

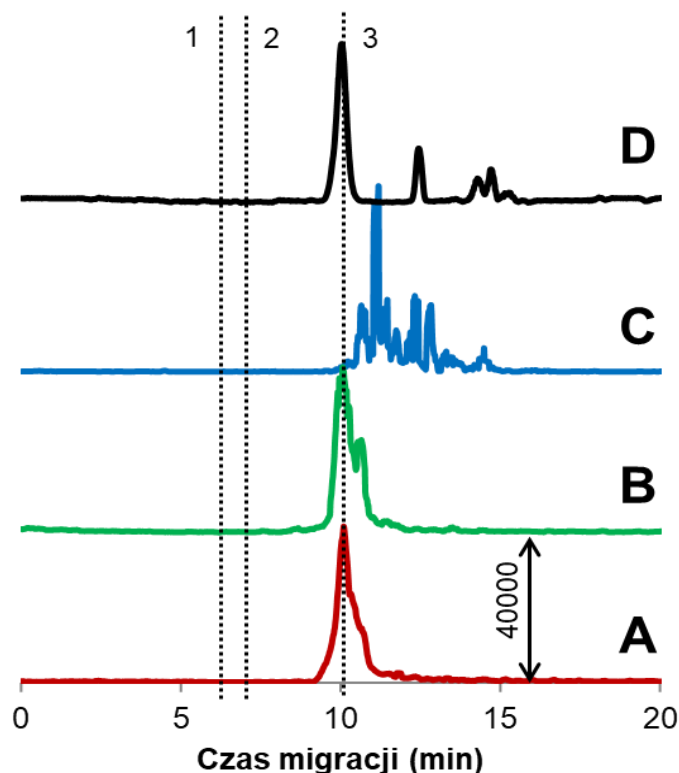
Przeprowadzono cykl prac mających na celu zbadanie przemian połączeń MNPs–białka surowicy krwi w warunkach symulujących cytozol komórek nowotworowych z użyciem techniki CE-ICP-MS.

Próbki do badań przygotowywano w sposób pokazany na **Rysunku 2** (inkubacja w ciągu 45 minut); następnie połączenia MNPs–białka były oddzielane od nieprzereagowanych składników surowicy poprzez ultrasączenie z użyciem filtrów o wielkości porów 100 kDa, rozcieńczane w symulowanym cytozolu komórek i inkubowane w 37 °C. Zmiany zachodzące w próbce w trakcie jej inkubacji były identyfikowane dzięki pojawianiu się dodatkowych sygnałów posiadających inne czasy migracji niż odpowiadające wyjściowym połączeniom AuNPs z białkami krwi.

Ustalono parametry metody CE-ICP-MS oferujące odpowiednią rozdzielczość i wykrywalność a umożliwiające obserwację rozpadu połączeń AuNPs z białkami surowicy krwi ludzkiej i tworzenia się nowych form zawierających złoto, w zależności od składu matrycy symulującej cytozol. Odpowiednie okazały się warunki rozdzielania stosowane w badaniach oddziaływań AuNPs z białkami surowiczymi (**Tabela 2**). Sprawdzone również wpływ rozcieńczenia cytozolu ludzkiego (zakupiony wzorzec) na odzysk analitów z kapilary. Stwierdzono, że rozcieńczenie 100-krotne pozwala na uzyskiwanie powtarzalnych i miarodajnych wyników nie powodując adsorpcji składników matrycy (białek cytoplazmatycznych) na wewnętrznej powierzchni kapilary elektroforetycznej.

Elektroferogramy połączeń AuNPs (20 nm)–białka surowicy w roztworach symulowanego cytozolu o różnym składzie przedstawiono na **Rysunku 9**. W warunkach cytozolu komórki prawidłowej (9A) połączenia AuNP–HSA nie ulegały zmianom, które wpływałyby na ich ruchliwość elektroforetyczną. Zmniejszenie pH próbki (do poziomu cytozolu nowotworowego, z 7,4 do 6,0; 9B) także nie powodowało znaczących zmian rejestrowanych na elektroferogramie. Wprowadzenie do próbek glutationu, kwasu askorbowego oraz kwasu cytrynowego (nadprodukowanych w komórkach nowotworowych

w porównaniu do prawidłowych) prowadziło do rozpadu połączeń AuNP z HSA i tworzenia nowych form zawierających Au (9C).



**Rys. 9.** Elektroferogramy ilustrujące przebieg zmian połączeń AuNPs (20 nm)–białka surowicy pod wpływem różnych warunków symulowania cytozolu (A-D); czas inkubacji 30 minut; stężenie Au: 19 mg L<sup>-1</sup>; linie przerywane oznaczają czasy migracji połączeń: 1,2 - AuNP–Tf (kolejno hTf i aTf); 3 - AuNP–HSA; warunki rozdzielania podano w Tabeli 2 [H8].

Zmiany AuNP–HSA w medium o składzie odpowiadającym cytozolowi komórki nowotworowej w obecności związków redukujących, lecz nie zawierającym matrycy cytozolu (a jedynie bufor fosforanowy 10 mM o pH 6,0; 9D) mają inny charakter niż w przypadku próbek zawierających wzorec cytozolu ludzkiego. Może to sugerować, że głównymi cząsteczkami indukującymi zmiany form chemicznych AuNPs są składniki cytozolu tj. białka lub inne mało- i wielkocząsteczkowe związki.

W przypadku połączeń AuNPs z Tf, niezależnie od składu roztworu symulującego, obserwowano natychmiastowy niemal rozpad koron białkowych, co może być przesłanką do potwierdzenia kluczowej roli tego białka w efektywnym transportowaniu i uwalnianiu MNPs w komórkach. Hipotezę potwierdza fakt, że w przypadku analogicznych doświadczeń, prowadzonych dla AuNPs o rozmiarze 50 nm (dla których procent udziału Tf w surowiczych koronach białkowych był największy a czas cykulacji najdłuższy) także obserwowano dynamiczny rozpad połączeń AuNP–Tf, ale skutkujący powstawaniem zupełnie innych form zawierających Au niż w przypadku AuNPs o mniejszych rozmiarach.

Badania przeprowadzone w powyższym obszarze potwierdziły stosowalność techniki CE-ICP-MS jako narzędzia do efektywnego monitorowania przebiegu zmian form chemicznych AuNPs w próbkach (symulowanego) cytozolu komórkowego.

- *Badanie usytuowania i zmian AuNPs w komórkach nowotworowych [H9]*

Celem badań było zaproponowanie kompleksowego sposobu monitorowania i oznaczania form złota w przedziałach komórkowych i jądrze po pobraniu AuNPs z zastosowaniem komplementarnych metod z detekcją ICP-MS. W badaniach wykorzystano cztery techniki pozwalające na tworzenie całościowego obrazu usytuowania i zmian AuNPs w komórkach ludzkich (zgodnie z moją wiedzą jest to pierwsza tego typu platforma bioanalityczna, zastosowana do badania transportu wewnątrzkomórkowego MNPs).

Opracowano metodykę frakcjonowania komórek po testach pobierania AuNPs (preinkubowanych z surowicą, po 24 h pobierania do komórek), przed ilościową weryfikacją usytuowania form Au w przedziałach komórkowych (komórek MCF-7 oraz MCF-10a). Kluczowym problemem w efektywnym badaniu lokalizacji oraz zmian MNPs w tkankach biologicznych z wykorzystaniem ICP-MS jest wyekstrahowanie ich oraz pochodzących od nich form metalu w taki sposób, aby nie zaburzyć stanu równowagi panującego w próbce. Dotychczas stosowane sposoby lizy błon komórkowych tj. sonoliza czy trawienie enzymatyczne były inwazyjne i niosły ze sobą ryzyko zanieczyszczenia próbek. W ramach prowadzonych prac zmniejszono liczbę dokonywanych operacji. Proces lizy komórkowej indukowano za pomocą szoku osmotycznego, będącego reakcją na zawieszenie komórek w buforze MES (kwas 2-(N-morfolino)etanosulfonowy) o stężeniu 10 mM. Tak przygotowane próbki wirowano wyodrębniając dwie frakcje: błon komórkowych i cytozolu z organellami, które później poddawano mineralizacji i analizie za pomocą techniki ICP-MS.

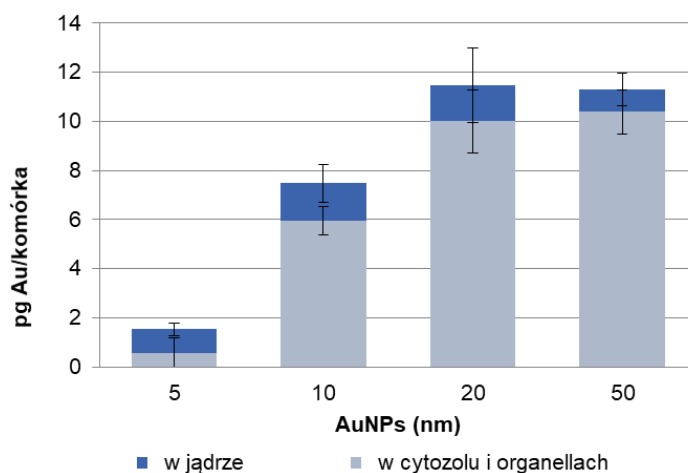
Kolejne zaproponowane postępowanie było oparte na lizie błon komórkowych z zastosowaniem homogenizatora Dounce'a oraz kilkukrotnym wirowaniu różnicowym w gradiencie sacharozy. W efekcie otrzymywano frakcję jądra komórkowego, poddawaną następnie mineralizacji i analizie za pomocą ICP-MS. Taka metodyka umożliwiała badanie stopnia pobierania MNPs (świadczącego o ich wpływie na cykl komórkowy) do jądra – kluczowego organellum dla funkcjonowania komórki.

Frakcje błon komórkowych, cytozolu z organellami i jądra komórkowego w pierwszej kolejności analizowano za pomocą techniki bezpośredniej (konwencjonalnej) ICP-MS w celu dokładnego i precyzyjnego oznaczenia złota. Stwierdzono, że formy Au po pobraniu AuNPs przez komórki obydwu typów (MCF-7 vs. MCF-10a) znajdują się zarówno we frakcji cytozolu i organelli, jak i w błonach komórkowych. Większa część pobranego Au obecna była w błonach komórkowych (wyjątkiem było pobieranie 5 nm AuNPs przez komórki MCF-7). W przypadku komórek prawidłowych stwierdzono większą zawartość Au w błonach komórkowych niż przy badaniu komórek nowotworowych, co spowodowane może być odmiennymi mechanizmami pobierania NPs na skutek zmian w przebiegu metabolizmu komórek nowotworowych.

Analizując natomiast frakcje jądra komórkowego stwierdzono, że zawartość złota w nich nie zależy od rozmiarów AuNPs i wynosi mniej niż 2 pg na komórkę (**Rysunek 10**). Jednak w przypadku najmniejszych AuNPs (5 nm) zawartość Au we frakcji jąder komórkowych stanowi prawie 50% całkowitej zawartości Au w komórce, dla większych

natomiast 4–10%, co świadczyć może, że transport złota do jądra komórkowego (pochodzącego z większych nanocząstek) nie jest preferowany.

Uzyskane wyniki pozwoliły na wybór do dalszych badań AuNPs o rozmiarach 20 i 50 nm, gwarantujących największy stopień ich pobierania do wnętrza komórek nowotworowych. Ze względu na małą zawartość złota w jądrach, analizie poddawano jedynie frakcje cytozolu i organelli.

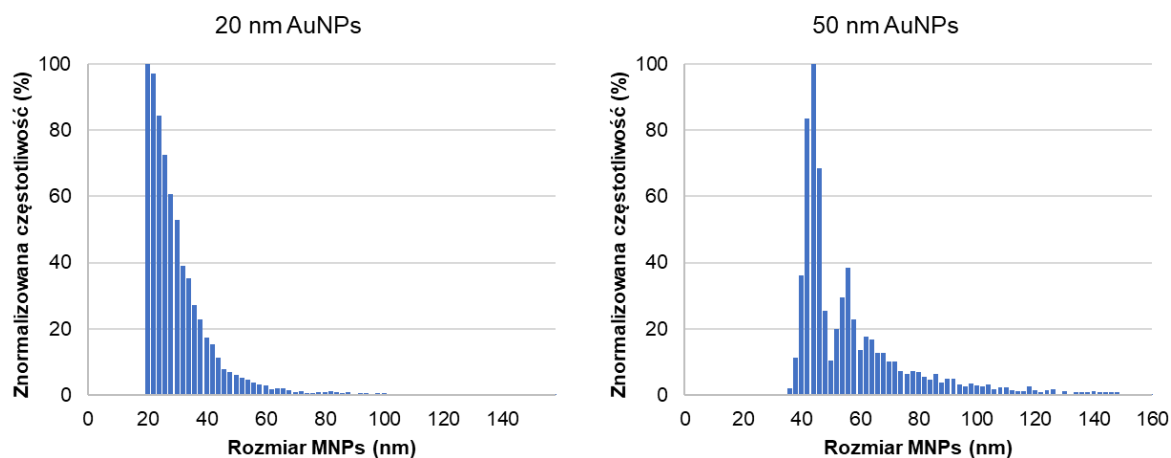


**Rys. 10.** Średnia zawartość złota w frakcjach jądra komórkowego i cytozolu z organellami, wyizolowanych z komórek MCF-7 inkubowanych z AuNPs–białka surowicze przez 24 h ( $n = 3$ ) [H9]

Do ilościowego i jakościowego scharakteryzowania zmian układów AuNPs–białka surowicy w cytozolu wyizolowanym z komórek nowotworowych wybrano przetestowaną wcześniej technikę CE-ICP-MS. Stwierdzono, że korony z białek surowicznych ulegały praktycznie całkowitemu przekształcaniu w środowisku komórki nowotworowej (stopień konwersji około 99%). Wyodrębniono sygnały różnych form zawierających Au, powstających po pobraniu AuNPs przez komórki nowotworowe do cytozolu komórkowego. Wykazano, że AuNPs o różnych rozmiarach (20 nm lub 50 nm) wewnątrz komórek tworzą odmienne formy zawierające Au (inne czasy migracji), co świadczyć może o uzależnieniu ścieżek metabolizmu MNPs od ich rozmiaru. Niestety, stosowana technika nie pozwoliła na rozdzielenie sygnałów do linii bazowej i nie dostarczyła informacji na temat charakteru/rozmiaru nowopowstałych form złota. Zdecydowano zatem kontynuować badania z użyciem innych rozwiązań aparaturowych z detekcją ICP-MS: w trybie analizy pojedynczej cząstki (spICP-MS) i w połączeniu z wysokosprawną chromatografią cieczą w odwróconym układzie faz (RP-HPLC-ICP-MS). Były one dotychczas stosowane rzadko do badania zmian MNPs wewnątrz komórek nowotworowych. Częściej z ich użyciem badano zmiany MNPs w próbkach o mniej skomplikowanych matrycach, tj. medium komórkowe czy surowica krwi. Ponadto w pracach prowadzonych z ich udziałem nie uwzględniano etapu tworzenia korony białkowej (poprzez pre-inkubację MNPs w surowicy krwi ludzkiej) przed ich inkubacją z komórkami. W niniejszej rozprawie po raz pierwszy zastosowano przedstawiony wyżej zestaw technik do uzyskania informacji dotyczących zmian formy chemicznej AuNPs oraz ich oddziaływań z biocząsteczkami po pobraniu przez komórki nowotworowe.



spICP-MS został wykorzystany do określenia charakteru form złota (formy jonowe lub nanometryczne) w cytozolu komórek MCF-7 po ich inkubacji z AuNPs, a także do wyznaczenia rozmiaru rdzenia MNPs/ich aglomeratów po pobraniu do wnętrza komórek. Technikę tę (w porównaniu z konwencjonalnym ICP-MS) charakteryzuje skrócony czas integracji pomiaru (1–10 ms vs. 50–500  $\mu$ s), związany z czasem przebywania chmury jonowej jednej nanocząstki w plazmie. Zbyt długi czas integracji mógłby prowadzić do rejestracji większej liczby MNPs w jednym przedziale czasowym (impulsie pomiarowym), powodując błędy w wyznaczaniu rozmiaru rdzenia. W przypadku dużego stężenia jonów metalu w próbce, wydłużenie czasu integracji powoduje zwiększenie wartości granicy wykrywalności rozmiaru MNPs. Zastosowanie natomiast dłuższego czasu analizy (w spICP-MS to 60 s) pozwala zminimalizować zagrożenie występowania podczas pomiaru przedziałów czasowych, w których dane nie są zbierane. W przypadku badania frakcji cytozolu z użyciem AuNPs o rozmiarach 20 i 50 nm zarejestrowano charakterystyczne sygnały impulsowe AuNPs, co potwierdziło obecność złota w formie nanometrycznej. AuNPs o średnicach 20 nm po pobraniu przez komórki MCF-7 tworzą struktury o większym rozmiarze; te o średnicach 50 nm częściowo rozpadają się, a częściowo tworzą formy o większej średnicy niż nominalna (**Rysunek 11**). Potwierdza to wcześniej zaobserwowaną (przy użyciu CE-ICP-MS) odmienną procesów metabolicznych MNPs w zależności od ich rozmiaru. W żadnej z badanych próbek nie zaobserwowano obecności frakcji rozpuszczonej metalu (form jonowych).



**Rys. 11.** Rozkład rozmiarów AuNPs w frakcjach cytoplazmatycznych otrzymanych po inkubacji AuNPs o rozmiarach 20 i 50 nm (w formie koron z białkami surowiczymi) z komórkami MCF-7 przez 24 h [H9]

Technika spICP-MS nie dostarcza informacji na temat charakteru oddziaływań składników cytozolu komórkowego z powierzchnią AuNPs. W tym celu niezbędne jest zastosowanie innej – wybrano RP-HPLC-ICP-MS, która między innymi pozwala na wyznaczanie średnic hydrodynamicznych form nanometrycznych zawierających Au. Do tej pory była ona wykorzystywana do badania AuNPs głównie z użyciem detekcji UV-VIS lub fluorymetrycznej. Zaproponowane przeze mnie połączenie RP-HPLC z detekcją ICP-MS było dotychczas, jak już wspomniano, zastosowane do analizy próbek NMs pochodzenia biologicznego, a o mniej skomplikowanej matrycy, jedynie w kilku pracach.

Zoptymalizowano warunki rozdzielania chromatograficznego w celu uzyskania jak najlepszej rozdzielczości sygnałów formy jonowej metalu i AuNPs o różnych rozmiarach. Przy stosowaniu kolumn RP-HPLC o dużej średnicy porów (100 lub 400 nm), przeznaczonych do rozdzielania obiektów nanometrycznych, mechanizm procesu i kolejność elucji analitów są zbliżone do obserwowanych w chromatografii rozmiarów wykluczania. Dzięki temu stwierdzono, że AuNPs po pobraniu przez komórki MCF-7 charakteryzują się większą średnicą hydrodynamiczną niż nominalna i potwierdzono, że nie ulegają rozpadowi. Średnica hydrodynamiczna wyznaczona za pomocą RP-HPLC jest większa, niż średnice rdzeni oznaczone za pomocą spICP-MS - może to potwierdzać hipotezę, że w wewnątrzkomórkowych zmianach AuNPs biorą aktywny udział małych i wielkocząsteczkowe składniki cytozolu.

Przeprowadzone badania wykazały, że zastosowanie komplementarnych technik z detekcją ICP-MS stanowi skuteczne narzędzie badania rozmieszczenia i zmian AuNPs w komórkach nowotworowych. Opracowane metodyki mogą być stosowane w badaniach przedklinicznych zachowań MNPs prowadzonych *in vitro*. Uzyskane wyniki poszerzyły wiedzę na temat istotnych procesów biologicznych, w których MNPs o potencjalnym zastosowaniu medycznym biorą udział wewnątrz komórek.

#### 4.3.2.3. Poszerzenie zastosowań połączenia CE z ICP-MS do badania nowych rodzajów analitów [H10-H12]

Opracowanie metodyk, służących badaniu metalonanomateriałów: AuNPs, AuNRs, QDs, stanowiło punkt wyjścia do rozszerzenia pola zainteresowań na anality, których zmiany w płynach ustrojowych nie były jak dotąd charakteryzowane lub były, lecz w sposób pośredni. Przyczyną powyższego stanu były trudności natury analitycznej [H10] lub wstępny charakter opracowanych dotychczas metodyk dedykowanych nowoczesnym rozwiązaniom nanomedycznym [H11].

- *Połączenie CE z tandemową spektrometrią mas ICP do charakteryzowania MNPs o właściwościach superparamagnetycznych w mieszaninach fizjologicznych [H10]*

Obiektem badań w tej części rozprawy były superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza(II, III) (SPIONs, ang. *superparamagnetic iron oxide nanoparticles*), zaaprobowane materiały do diagnozowania nowotworów za pomocą rezonansu magnetycznego (tzw. SPIONs I generacji). Badane jest również ich potencjalne zastosowanie jako teranostyków. Jedną z unikatowych właściwości tych materiałów, mającą kluczowe znaczenie dla atrakcyjności medycznej, jest superparamagnetyzm. Zjawisko to obserwowane jest u MNPs o wymiarach mniejszych niż rozmiar jednej domeny magnetycznej (do około 30 nm), a polega na namagnesowaniu SPIONs jedynie w obecności zewnętrznego pola magnetycznego.

Prowadzone jest obecnie wiele prac badawczych dotyczących superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza i charakteryzowania ich oddziaływań z innymi indywidualnymi chemicznymi; techniki łączone z detekcją ICP-MS nie były jednak

do tej pory stosowane lub były używane jedynie jako narzędzia pomocnicze. Przyczyną takiego stanu są trudności natury analitycznej, związane z występowaniem spektralnych wpływów przeszkadzających w oznaczaniu najbardziej rozpowszechnionego w naturze izotopu żelaza:  $^{56}\text{Fe}$ , będącego jednocześnie markerem SPIONs. Oznaczanie żelaza (jako jonu  $^{56}\text{Fe}^+$  o stosunku masy do ładunku  $m/z = 56$ ) za pomocą konwencjonalnego ICP-MS (z jednym analizatorem kwadropolowym) obarczone jest istotnym wpływem przeszkadzającym jonów poliatomowych o takim samym  $m/z$  jak analit, tworzących się z udziałem gazu nośnego – argonu ( $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ ) lub wapnia występującego w badanych próbkach ( $^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$ ). Zjawiska te powodują podnoszenie poziomu linii bazowej i nieprawidłowych zliczeń izotopu żelaza, co skutkuje zmniejszeniem czułości oznaczenia a wręcz jego uniemożliwieniem. Jednym ze stosowanych sposobów eliminacji wpływów przeszkadzających podczas oznaczania żelaza jest zastosowanie przed analizatorem mas dynamicznej komory reakcyjnej (DRC, ang. *dynamic reaction cell*). Mieszanina jonów generowanych w palniku plazmowym i dostających się do DRC jest traktowana strumieniem cząsteczek obojętnego gazu, którego zadaniem jest zderzenie lub reakcja (przeniesienie ładunku/atomu) z jonami przeszkadzającymi, co skutkuje ich rozbitiem lub zmianą  $m/z$ . ICP-DRC-MS zapewnia zmniejszenie granicy wykrywalności izotopu  $^{56}\text{Fe}$  jednak wartości tego parametru nadal znacząco odbiegają od obserwowanych w przypadku oznaczania innych metali (nieobarczonych interferencjami). Dzieje się tak, ponieważ w DRC oddziaływaniom z gazem obojętnym podlegają wszystkie jony wytworzone w palniku plazmowym i zachodzące w nim procesy mogą być wielotorowe. Dzięki ICP-DRC-MS nie ma również możliwości efektywnego monitorowania zliczeń impulsów innego, fizjologicznie kluczowego, a narażonego na spektralne wpływy przeszkadzające, izotopu –  $^{32}\text{S}$ . Izotop ten, będący markerem np. białek, charakteryzuje się wartością  $m/z$  identyczną jak jon  $^{16}\text{O}_2^+$ , którego nie można wyeliminować za pomocą DRC.

Celem prac przeprowadzonych w ramach rozprawy habilitacyjnej było rozwiązanie zarysowanych problemów dzięki wykrywaniu markera SPIONs z zastosowaniem tandemowego spektrometru mas z jonizacją ICP (ICP-MS/MS). W aparacie tym układ podobny do DRC-ICP-MS jest poprzedzony dodatkowym analizatorem mas, którego zadaniem jest selekcja i filtrowanie jonów macierzystych o zadanym  $m/z$ , tak by tylko one mogły docierać do komory kolizyjno-reakcyjnej (CRC, ang. *collision-reaction cell*). Układ analizator–CRC–analizator gwarantuje nie tylko bardziej efektywną eliminację interferencji poliatomowych w komorze, ale także daje możliwość selektywnego reagowania jonów analitu z cząsteczkami gazu reakcyjnego i zmianę ich  $m/z$ . Umożliwiło to optymalizację metody jednoczesnego oznaczania nie tylko żelaza (jako markera SPIONs), ale także siarki (jako markera oddziaływań MNPs z białkami). Badania wzbogacono o analizę form chemicznych SPIONs w próbkach symulujących warunki fizjologiczne, łącząc CE z ICP-MS/MS. Poszukiwanie efektywnego narzędzia do monitorowania siarki zawęziło możliwości doboru BGE w CE, gdyż nie mógł on zawierać tego pierwiastka - składnika wszystkich stosowanych uprzednio w ramach rozprawy buforów.

Sprawdzono możliwość stosowania w charakterze BGE buforów fosforanowego, węglanowego i wodorowęglanowego (amoni) o różnych stężeniach. Kryteriami

porównawczymi były: rozdzielczość sygnałów dwóch wzorców SPIONs różniących się grupami końcowymi funkcjonalizatora ( $-\text{COOH}$  lub  $-\text{NH}_2$ ), suma pól powierzchni ich sygnałów, a także sumaryczny odzysk analitów z kapilary. Sprawdzone również wpływ przykładanego napięcia i objętości dozowanej próbki na efektywność rozdzielania. Badania były poprzedzone optymalizacją przepływu gazu reakcyjnego ( $\text{O}_2$ ) w CRC, mającą na celu osiągnięcie jak największych wartości stosunku sygnału stosowanego wzorca wewnętrznego (wanad) do szumu i stopnia konwersji  $^{51}\text{V}^+ \rightarrow ^{51}\text{V}^{16}\text{O}^+$ . Optymalne warunki rozdzielania, tak jak i otrzymane parametry opracowanej metody analitycznej przedstawiono w **Tabeli 3**. Uzyskane wartości granic wykrywalności były porównywalne z opublikowanymi uprzednio dla badań prowadzonych za pomocą techniki HPLC-ICP-MS/MS, która jednak nie pozwalała na jednoczesne monitorowanie siarki.

**Tabela 3** Optymalne parametry rozdzielania i detekcji dwóch rodzajów wzorców SPIONs za pomocą CE-ICP-MS/MS

<i>parametr</i>	<i>SPIONs-COOH</i>	<i>SPIONs-NH<sub>2</sub></i>
<i>kapilara rozdzielająca</i>	<i>ze stopionej krzemionki, ID 75 <math>\mu\text{m}</math>, OD 375 <math>\mu\text{m}</math>, długość 70 cm</i>	
<i>monitorowane jony</i>	<i><math>^{56}\text{Fe}^+ \rightarrow ^{56}\text{Fe}^+</math>, <math>^{56}\text{Fe}^+ \rightarrow ^{56}\text{Fe}^{16}\text{O}^+</math>, <math>^{51}\text{V}^+ \rightarrow ^{51}\text{V}^{16}\text{O}^{+a}</math>, <math>^{32}\text{S}^+ \rightarrow ^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+</math></i>	
<i>przepływ <math>\text{O}_2</math> w komorze [<math>\text{mL min}^{-1}</math>]</i>	<i>0,48</i>	
<i>BGE</i>	<i>20 mM wodorowęglan amonu, pH 7,4</i>	
<i>przyłożone napięcie [<math>\text{kV}</math>]</i>	<i>+ 18</i>	
<i>dozowanie próbki [<math>\text{mbar}\times\text{s}</math>]</i>	<i>50<math>\times</math>5</i>	
<i>testowane stężenia MNPs [<math>\text{mg L}^{-1}</math>]</i>	<i>30–50</i>	
<i>średni odzysk z kapilary [%]<sup>b</sup></i>	<i>96,7</i>	<i>93,3</i>
<i>powtarzalność <math>t_m</math> [%]<sup>c</sup></i>	<i>0,2</i>	<i>0,5</i>
<i>odtworzalność <math>t_m</math> [%]<sup>b</sup></i>	<i>1,9</i>	<i>3,3</i>
<i>powtarzalność <math>P_P</math> [%]<sup>c</sup></i>	<i>4,3</i>	<i>2,8</i>
<i>odtworzalność <math>P_P</math> [%]<sup>b</sup></i>	<i>5,0</i>	<i>5,0</i>
<i>LOD [<math>\mu\text{g L}^{-1}\text{Fe}</math>]</i>	<i><math>^{56}\text{Fe}^+ \rightarrow ^{56}\text{Fe}^+</math></i>	<i>2,9</i>
	<i><math>^{56}\text{Fe}^+ \rightarrow ^{56}\text{Fe}^{16}\text{O}^+</math></i>	<i>54</i>
		<i>101</i>

*a – wzorzec wewnętrzny; b – n = 3; c – n = 6; reszta oznaczeń – patrz Tabela 2*

Zoptymalizowaną metodę CE-ICP-MS/MS zastosowano do badania stabilności SPIONs w roztworach imitujących warunki fizjologiczne i zmian wynikających z powstawania koron białkowych na powierzchni SPIONs w obecności białka HSA. W obu przypadkach rozdzielczość metody była wystarczająca do wyodrębnienia nowopowstałych form zawierających żelazo a pochodzących od SPIONs. W pierwszym przypadku

zanotowano na elektroferogramach obecność sygnału produktu rozpadu MNPs do formy rozpuszczonej ( $\text{FeCl}_2$ ), zaś w drugim sygnał pochodzący od połączeń SPION–HSA.

Przeprowadzone badania wykazały analityczną użyteczność połączenia CE z detekcją ICP-MS/MS do monitorowania zmian MNPs, zbudowanych z pierwiastków „analitycznie problematycznych” w złożonych materiałach biologicznych. Istotną zaletą opracowanej metodyki jest możliwość prowadzenia rozdziełań w łagodnych warunkach – bez udziału rozpuszczalników organicznych czy surfaktantów, co jest często nieodzowne w przypadku zastosowania technik chromatograficznych.

*Badania były częścią projektu Opus Narodowego Centrum Nauki (2018/29/B/ST4/00178), w którym pełniłam funkcję wykonawcy.*

- *Zastosowanie CE-ICP-MS do ilościowego i jakościowego monitorowania procesu tworzenia połączeń metalolek przeciwnowotworowy–nośnik MNPs [H11-H12]*

Cisplatyna (cis-diaminodichloroplatyna(II), CDDP) jest jednym z najczęściej stosowanych metaloleków przeciwnowotworowych, skutecznym w terapiach przeciwko wielu guzom litym. Niestety nieselektywny transport leku także do komórek prawidłowych powoduje szereg skutków ubocznych jego stosowania, np. nefro- i neurotoksyczność, czy mielodysplazję szpiku kostnego. Skuteczność leku w długotrwałej chemioterapii może być ograniczana ze względu na szybko rozwijający się mechanizm lekooporności komórek nowotworowych. Rozwiązania przedstawionych problemów upatruje się w stosowaniu tzw. celowanych systemów dostarczania leku (DTDSs, ang. *drug targeted delivery systems*) opartych na nano-nośnikach, których zadaniem jest m.in. promowanie preferencyjnej akumulacji CDDP w komórkach nowotworowych i poprawa efektywności terapii. Użycie MNPs ukierunkowanych na transport do komórek nowotworowych jako selektywnych nośników leków umożliwia spowolnienie zmian metabolicznych leku, wydłużenie czasu jego krążenia we krwi i specyficzną akumulację w chorych tkankach. Jest to możliwe dzięki występowaniu EPR lub preferencyjnego transportu aktywnego poprzez receptory (np. TfR) nadekspresowane przez komórki nowotworowe.

W celowanych systemach dostarczania leku próbowano stosować różne MNPs. Na szczególną uwagę, dzięki inercji, nietoksyczności, biokompatybilności, łatwości syntezy i modyfikacji powierzchni, zasługują AuNPs. W oparciu o wyniki badań *in vivo* prowadzonych na zwierzętach stwierdzono, że ich połączenie z cisplatyną zmniejsza szkodliwość leku stosowanego w ich nieobecności w stosunku do komórek prawidłowych, poprawiając jednocześnie cytotoksyczność względem tkanek zmienionych nowotworowo. Pomimo tak obiecujących wstępnych wyników ewentualne zakwalifikowanie układów AuNPs–CDDP do testów klinicznych na ludziach wymaga dokładnego zbadania profilu tworzenia i stabilności połączenia w czasie. Może stać się to możliwe po opracowaniu zaawansowanej metodyki analitycznej, która będzie odznaczać się dużą rozdzielczością i dobrą czułością. Monitorowanie tworzenia platynowych DTDSs z metalonano-nośnikami dotychczas było prowadzone głównie za pomocą technik obrazowania (mikroskopii elektronowych transmisyjnej/skaningowej lub mikroskopii fluorescencyjnej), metod półilościowych/jakościowych (spektroskopii w podczerwieni czy magnetycznego rezonansu

jądrowego, spektrofotometrii) lub pośrednich (HPLC z detekcją spektrofotometryczną – oznaczanie pozostałości CDDP w przesączu; ICP-MS – oznaczanie całkowitej zawartości platyny w produkcie). Żadna z wymienionych technik nie umożliwia jednoczesnego rozdzielania poszczególnych form układu, obserwowania ich zmian w czasie trwania doświadczenia, a także charakterystyki ilościowej. Z tego względu otworzyłam kolejną ścieżkę badawczą prowadzącą do opracowania metody efektywnego oddzielania produktów reakcji AuNPs z CDDP od nieprzereagowanych substratów za pomocą CE oraz ich specyficznego izotopowo oznaczania i detekcji on-line z zastosowaniem ICP-MS.

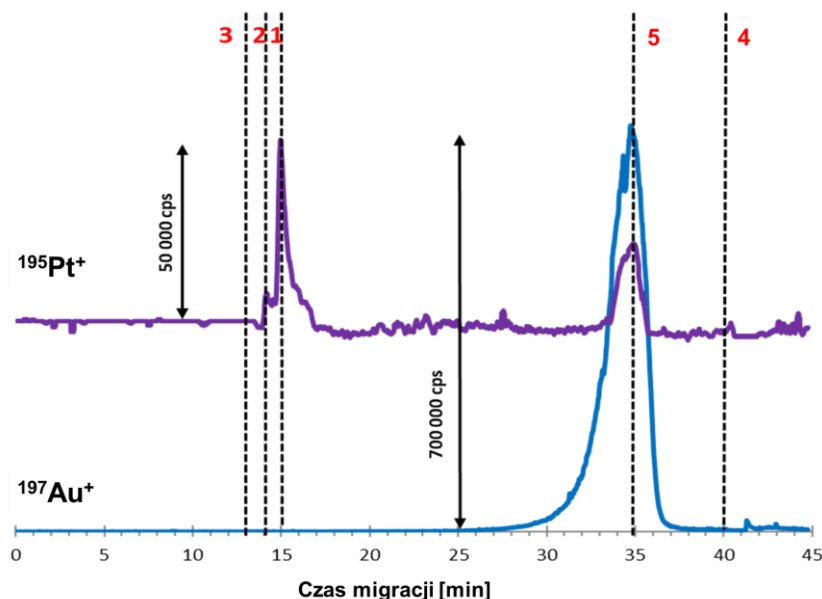
W etapie wstępnym przetestowano istniejące postępowania, rozpoczynając od przygotowania substratów do reakcji tworzenia DTDS - zmodyfikowano powierzchnię AuNPs za pomocą kwasu 11-merkaptoundekanoowego (MUA, ang. *mercaptoundecanoic acid*) oraz podjęto próbę aktywacji CDDP poprzez wymianę dwóch ligandów chlorkowych na hydroksylowe. Przebieg reakcji monitorowano za pomocą CE-ICP-MS, stosując warunki rozdzielania używane uprzednio do badania zmian AuNPs w surowicy krwi ludzkiej (**Tabela 2**); substraty charakteryzowano także za pomocą technik dynamicznego rozpraszania światła oraz spektrometrii mas z jonizacją poprzez elektrorozpraszanie (ESI-MS). Potwierdzono poprawność postępowania zaproponowanego do modyfikacji AuNPs (i stabilność w 4 °C przez około 6 dni) – zaobserwowano odmienne czasy migracji sygnałów  $^{197}\text{Au}^+$  przed i po reakcji modyfikacji (30 vs. 40 min). Niestety, aktywacja CDDP sposobem zaproponowanym w literaturze (ze strąceniem chlorku srebra podczas inkubacji, rekrytalizacją i przemywaniem etanolem) nie przyniosła spodziewanego efektu. Zrezygnowano z dwóch ostatnich etapów procesu, zastępując je odwirowaniem powstającego osadu. Wtedy roztwór znad osadu zawierał mieszaninę dwóch produktów reakcji i substratu (wyodrębniono 3 sygnały elektroforetyczne dla  $^{195}\text{Pt}^+$ ), z których pochodna dwupodstawiona grupami hydroksylowymi (CDDP\*) stanowiła około 50% (jej tożsamość potwierdzono za pomocą ESI-MS), a stabilność w 4 °C wyznaczono jako 5 h.

Zweryfikowano możliwość tworzenia DTDS na drodze połączenia produktów upochodnienia CDDP ze zmodyfikowanymi AuNPs–MUA. Stosowano różne stosunki molowe substratów, roztwory mieszano i analizowano za pomocą CE-ICP-MS. Na **Rysunku 12** przedstawiono elektroferogramy mieszaniny zawierającej AuNPs i CDDP w stosunku molowym 1:800. Zaobserwowano, że całkowitemu przereagowaniu z MNPs ulega jedynie dwupodstawiona pochodna CDDP, natomiast jednopodstawiona i podstawowa forma nie uczestniczą w reakcji (nawet po 72 h). Wspólny sygnał form złota ( $^{197}\text{Au}^+$ ) oraz platyny ( $^{195}\text{Pt}^+$ ) (o takim samym  $t_m$ , innym niż sygnałów substratów) obserwowano na elektroferogramach po czasie krótszym niż jedna godzina - potwierdzało to utworzenie DTDS [**H11**].

Otrzymane za pomocą CE-ICP-MS wyniki badań porównano z innymi istniejącymi doniesieniami, dotyczącymi zastosowania technik rozdzielania i łączonych w charakteryzowaniu układów nanoosnók–lek platynowy i wykazano zalety zaproponowanych rozwiązań względem tych dotychczas istniejących [**H12**].

Według mojej wiedzy opracowana metoda analityczna z wykorzystaniem techniki CE-ICP-MS została po raz pierwszy zastosowana jako narzędzie do badania tworzenia

i stabilności połączeń nanonośnik–lek przeciwnowotworowy bezpośrednio w mieszaninie reakcyjnej i w czasie rzeczywistym. Otwiera to możliwość dalszego rozwoju techniki w badaniu różnorodnych DTDSs.



**Rys. 12.** Elektroferogramy mieszaniny AuNPs–MUA z produktami aktywacji CDDP (1:800) po 2 h inkubacji; warunki pomiaru jak w Tabeli 2; oznaczenia charakterystycznych czasów migracji sygnałów: 1 – podstawowej formy CDDP, 2 – jednopodstawionej pochodnej CDDP, 3 – dwupodstawionej pochodnej CDDP (CDDP\*), 4 – AuNPs–MUA, 5 – DTDS (AuNPs–MUA–CDDP\*) [H11]

*Badania wykonywano w ramach projektu dziekańskiego ze środków subwencji oświatowej, którego byłam kierownikiem w latach 2018 – 2019.*

#### 4.3.3. Podsumowanie i dalsze kierunki rozwoju

W ramach rozprawy zaproponowałam nowe postępowania badawcze do charakteryzowania medycznie atrakcyjnych MNPs za pomocą ICP-MS. Umożliwiły one ilościowe monitorowanie zmian form chemicznych MNPs w złożonych matrycach biologicznych, z zachowaniem standardów kontrolowania jakości otrzymywanych wyników. Do realizacji celów niektóre z technik użyte były po raz pierwszy, natomiast zastosowanie techniki CE-ICP-MS – z sukcesem używanej jak dotąd jedynie w nielicznych laboratoriach z racji stopnia skomplikowania połączenia modułu rozdzielającego i detekcyjnego – pozwoliło również na badanie MNPs składających się z pierwiastków „problematycznych analitycznie”.

Uzyskane wyniki dostarczyły nowych informacji na temat procesów biologicznych, w których MNPs o potencjalnym zastosowaniu medycznym biorą udział w warunkach imitujących organizm ludzki. Umożliwiły również przedkliniczne scharakteryzowanie form chemicznych MNPs we krwi i po pobraniu do komórek nowotworowych/prawidłowych oraz zbadanie rozmieszczenia tych form. Wytypowano szereg parametrów, zarówno dotyczących MNPs jak i procesów zachodzących z ich udziałem, które powinny być brane pod uwagę przy projektowaniu efektywnych narzędzi terapeutyczno-diagnostycznych.

Za najważniejsze osiągnięcia przedstawione w cyklu publikacji [H1–H12], stanowiące istotny wkład w rozwój nauk chemicznych uważam w szczególności:

1. Pionierskie zastosowania techniki CE-ICP-MS/(MS) do monitorowania ilościowego:
  - zmian form chemicznych wybranych MNPs w surowicy krwi ludzkiej i cytozolu komórkowym;
  - zmian analitów, posiadających markery w postaci izotopów obarczonych wpływami interferencyjnymi (SPIONs – Fe, białka – S) z zastosowaniem tandemowego spektrometru mas;
  - tworzenia i stabilności układów metalo-nanonośnik–lek przeciwnowotworowy.
2. Opracowanie nowatorskiej platformy bioanalitycznej służącej charakteryzowaniu wewnątrzkomórkowych zmian MNPs:
  - zastosowanie po raz pierwszy zestawu komplementarnych technik z detekcją ICP-MS;
  - zaproponowanie metodyki badania stopnia pobierania AuNPs do komórek nowotworowych *in vitro* z uwzględnieniem podawanej formy MNPs i wykonaniem bilansu masy metalu.
3. Wykazanie najistotniejszych zalet i uniwersalności opracowanych metodyk analitycznych w porównaniu do postępowań uprzednio przedstawianych w dostępnej literaturze.

W ramach realizacji kolejnych celów naukowych planuję kontynuację i rozszerzenie podjętych tematów, a także rozpoczęcie prac w nowych obszarach. W najbliższej przyszłości moje badania będą dotyczyły m.in.:

- zaprojektowania SPIONs o zwiększonym powinowactwie względem transferyny i metodyk badania ich funkcjonalizacji *in situ* w surowicy krwi ludzkiej, za pomocą technik łączonych z detekcją ICP-MS/MS i ESI-MS/MS oraz wykorzystaniem postępowań proteomicznych typu *shotgun* (do 2023, w ramach projektu OPUS);
- studium przedklinicznego układów MNPs–metalolek przeciwnowotworowy, gwarantujących najlepszą selektywność dostarczania i efektywność uwalniania leku (do końca 2022, w ramach kierownictwa grantu ze środków wewnętrznych);
- opracowania prostych metod syntezy celowanych układów opartych na nanonośnikach liposomalnych, służących do transportu leków przeciwnowotworowych (w ramach współpracy międzynarodowej z Uniwersytetem w Zhejiang, Chiny);
- wdrożenia techniki *single cell* ICP-MS/MS do badania pobierania i rozmieszczenia leków przeciwnowotworowych i medycznie atrakcyjnych



MNPs w trójwymiarowych hodowlach komórek nowotworowych (w ramach współpracy z Katedrą Biotechnologii Medycznej na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej).

- zastosowania CE-ICP-MS/MS w symulowaniu zmian fizjologicznych połączeń MNPs–polimer i porównanie z układami MNPs–przeciwciała do zastosowań teranostycznych (w ramach współpracy międzynarodowej z Uniwersytetem w Brnie, Czechy);

**5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej**

Od początku działalności naukowej (2010) hrealizuję badania w oparciu o współpracę prowadzone z naukowcami z innych jednostek w kraju i z zagranicy, a wymiana potencjału naukowego była i jest podstawą do efektywnej realizacji szeregu projektów (**Załącznik 4** – lista publikacji).

W trakcie studiów doktoranckich badania częściowo realizowałam we współpracy z krajowymi instytucjami naukowymi i partnerami zagranicznymi w ramach Programu Międzynarodowych Projektów Doktoranckich Fundacji na rzecz Nauki Polskiej (MPD/2010/4): Wydziałem Chemii Uniwersytetu Warszawskiego (w osobie ko-promotora rozprawy: prof. Zbigniewa Czarnockiego), Instytutem Chemii Nieorganicznej Uniwersytetu w Wiedniu (VU) i Instytutem Geochemii i Chemii Analitycznej Rosyjskiej Akademii Nauk (RAS). W ramach programu odbyłam trzy staże naukowe: dwa w RAS (styczeń – lipiec 2012, kwiecień – lipiec 2013) i jeden w VU (marzec – kwiecień 2015). Tematyka staży koncentrowała się wokół badań kompleksów metali o potencjalnych właściwościach przeciwnowotworowych, będących na etapie testów klinicznych. Kopie potwierdzeń odbycia staży stanowią **Załącznik 7** do wniosku.

Wyjazdy te były impulsem do długotrwałej współpracy naukowej z prof. Andreiem Timerbaevem (RAS, 2011-2019) oraz prof. Bernhardem Kepplerem (VU, 2013-obecnie) – w tematyce rozprawy doktorskiej (kompleksy o działaniu przeciwnowotworowym) i habilitacyjnej (MNPs o potencjalnym zastosowaniu medycznym). Do trwających od wielu lat należą także współprace z prof. Luigim Messorim (Uniwersytet we Florencji, 2014-obecnie) – w zakresie syntezy i charakterystyki AuNRs oraz dr Swietłaną Aleksenko (Uniwersytet w Saratowie, 2011-obecnie). Szczegóły dotyczące moich badań, prowadzonych z innymi niż Politechnika Warszawska jednostkami naukowymi a zakończonymi opublikowaniem wspólnych prac, znajdują się w **Tabeli 4**. Kopie potwierdzeń utrzymywania najważniejszych współpracy międzynarodowych stanowią **Załącznik 8** do wniosku. W ostatnim okresie nawiązałam także nowe kontakty naukowe (2020-) z ośrodkami w: (i) Brnie, dotyczące rozpoczęcia prac z zakresu badania nowej generacji narzędzi diagnostycznych opartych na połączeniach MNPs i polimerów; (ii) Zhejiang, w ramach realizacji wspólnych prac dotyczących celowanego transportu leków za pomocą liposomów (planowany staż zagraniczny).

**Tabela 4** Aktywność naukowa w ramach współprac z innymi ośrodkami

Jednostka badawcza	Naukowiec	Lata wspólnej działalności	Pole badawcze	Liczba wspólnych publikacji JCR	Oznaczenia publikacji*
Rosyjska Akademia Nauk (Instytut Geochemii i Chemii Analitycznej; Rosja)	prof. A. Timerbaev	2011-2019	Zastosowanie CE do badania kompleksów przeciwnowotworowych, medycznie atrakcyjnych MNPs	20	D1-6, PD2-3, H1-8, PH1-4
	dr L. Foteeva	2012-2017	Badanie kompleksów przeciwnowotworowych i ich oddziaływań z DNA	5	D1, D3, PD2, PH1-2
	prof. S. Nosenko	2017	Zastosowanie ICP-MS w badaniu oddziaływań kompleksów przeciwnowotworowych z DNA	1	PH1
	prof. V. Karandashev	2017		1	PH1
Uniwersytet Wiedeński (Instytut Chemii Nieorganicznej; Austria)	prof. B. Keppler	2013-obecnie	Badania przeciwnowotworowych kompleksów Ga i Pt(IV), MNPs o potencjalnym zastosowaniu medycznym	4	D3, H1, H6, H7
	prof. M. Galanski	2014	Badania przeciwnowotworowych kompleksów Ga i Pt(IV)	1	D3
Uniwersytet w Saradowie (Instytut Chemii, Rosja)	dr hab. S. Aleksenko	2011-obecnie	Badania kompleksów przeciwnowotworowych, medycznie atrakcyjnych MNPs	7	D1-2, PD2-3, H5-6, PH1
	prof. S. Shtykov	2016	Badania MNPs o potencjalnym zastosowaniu medycznym	1	H2
Uniwersytet we Florencji (Wydział Chemiczny, Włochy)	prof. L. Messori	2014-obecnie	Synteza i charakteryzacja AuNRs	3	H1, H4, PH3
	dr F. Scaletti	2015-2017		3	H1, H4, PH3
Uniwersytet w Regensburgu (Niemcy)	prof. M. Matysik	2015	Badania medycznie atrakcyjnych MNPs	1	PD3

<b>Uniwersytet w Hiroszimie (Japonia)</b>	prof. T. Hirokawa	2014	Zastosowanie CE w badaniu kompleksów przeciwnowotworowych	1	D3
<b>Uniwersytet Warszawski (Wydział Chemiczny, Polska)</b>	prof. Z. Czarnocki	2014	Zastosowanie CE-ICP-MS w badaniu kompleksów przeciwnowotworowych	1	D2

\* - zgodnie z oznaczeniami zastosowanymi z Załączniku 4

## **6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę**

### **6.1. Osiągnięcia dydaktyczne**

Moje osiągnięcia dydaktyczne skupiają się głównie w trzech polach: prowadzeniu zajęć dydaktycznych dla studentów (12 rodzajów zajęć, **Tabela 5**), pełnieniu funkcji promotora pomocniczego prac doktorskich (4 prace, **Tabela 6**) oraz kierowania lub sprawowania opieki naukowej nad pracami dyplomowymi na stopień inżyniera lub magistra (łącznie 24 prace, **Tabela 7**), realizowanych w Politechnice Warszawskiej.

**Tabela 5** Zajęcia dydaktyczne prowadzone dla studentów Politechniki Warszawskiej

<b>Funkcja</b>	<b>Typ przedmiotu</b>	<b>Nazwa przedmiotu</b>	<b>Kod</b>	<b>Kierunek i stopień studiów</b>	<b>Okres</b>
<b>Kierownik przedmiotu</b>	wykład	Chemia analityczna	CH.BIK310.B	Biotechnologia, I	2018-obecnie
<b>Kierownik przedmiotu</b>	wykład	Nanomateriały w chemii analitycznej	CH.TMS1044.A	Technologia Chemiczna, II	2019-obecnie
<b>Prowadzący</b>	laboratorium	Laboratorium analizy instrumentalnej	CH.TIK4001.A	Technologia Chemiczna, I	2011-obecnie
<b>Prowadząca</b>	laboratorium	Chemia analityczna	CH.BIK302.A	Biotechnologia, I	2012-obecnie
<b>Prowadzący</b>	laboratorium	Metrologia biochemiczna oraz akwizycja pomiarowa	CH.BIOB011.A	Biotechnologia, II	2013-obecnie
<b>Prowadzący</b>	laboratorium	Analityczne techniki plazmowe	CH.TMS1013.A	Technologia Chemiczna, II	2018-obecnie

<b>Prowadzący</b>	laboratorium	Chemia	IC.IK201.A	Inżynieria Chemiczna i Procesowa, I	2018-obecnie
<b>Prowadzący</b>	laboratorium	Laboratorium analizy ilościowej	CH.TIK3002.A	Technologia Chemiczna, I	2018-obecnie
<b>Prowadzący</b>	laboratorium	Laboratorium charakteryzacji materiałów	CH.TMS1038.A	Technologia Chemiczna, II	2018-obecnie
<b>Prowadzący</b>	laboratorium	Chemia analityczna	IC.IK311.A	Inżynieria Chemiczna i Procesowa, I	2018-obecnie
<b>Prowadzący</b>	projekt	Analytical methods in biotechnology	CH.BMSA124.A	Biotechnologia, II	2019-obecnie
<b>Prowadzący</b>	laboratorium	Badania naukowe	CH.PRBADAW.A	Technologia Chemiczna, I	2020-obecnie

**Tabela 6** Promotorstwo pomocnicze prac doktorskich realizowanych w Politechnice Warszawskiej

<b>Dane doktoranta</b>	<b>Status studiów/przewodu</b>	<b>Okres</b>
<b>dr inż. Joanna Kruszewska</b>	<b>Uzyskanie stopnia doktora: 25.02.2020</b> ; tytuł: Zastosowanie spektrometrii mas do badania wewnątrzkomórkowych przemian metalonanomateriałów o potencjalnych właściwościach terapeutyczno-diagnostycznych; <b>rozprawa wyróżniona</b>	2016-2020
<b>mgr inż. Monika Kupiec</b>	<b>Otwarcie przewodu doktorskiego: 16.04.2019</b> ; tytuł: Badania przemian in vitro cytotoksycznych kompleksów złota i rutenu za pomocą cząsteczkowej spektrometrii mas	2014-obecnie
<b>mgr inż. Anna Wróblewska</b>	Uczestnik II roku Szkoły Doktorskiej	2019-obecnie
<b>mgr inż. Jacek Sikorski</b>	Uczestnik II roku Szkoły Doktorskiej	2019-obecnie

**Tabela 7** Kierownictwo i opieka naukowa nad pracami dyplomowymi

<b>Funkcja</b>	<b>Typ dyplomu</b>	<b>Dane studenta</b>	<b>Temat Pracy</b>	<b>Kierunek studiów</b>	<b>Rok akademicki</b>
<b>Kierująca pracą</b>	magisterski	Ewelina Kamińska	Badanie enkapsulacji leku przeciwnowotworowego – cisplatyny, w liposomach za pomocą wybranej techniki rozdzielania połączonej z ICP-MS/MS	Technologia Chemiczna	2020/2021

<b>Opiekun naukowy</b>	magisterski	Anna Złowodzka	Badanie zmian powinowactwa nanocząstek Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> do białek surowicy krwi ludzkiej wywołanych modyfikacją powierzchni lub domieszkowaniem nanomateriału	Biotechnologia	2020/2021
<b>Kierujący pracą</b>	inżynierski	Jan Samsonowicz-Górski	Optymalizacja metod syntezy i oznaczania liposomów za pomocą techniki łączonej z detekcją ICP-MS/MS	Technologia Chemiczna	2020/2021
<b>Opiekun naukowy</b>	inżynierski	Agnieszka Kamińska	Optymalizacja metody badania parametrów nanocząstek Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> za pomocą techniki ICP-MS/MS w trybie analizy pojedynczej cząstki	Technologia Chemiczna	2020/2021
<b>Kierujący pracą</b>	magisterski	Aleksandra Milewska	Opracowanie metodyki badania zmian układu nanonośnik złota–cisplatyna w surowicy krwi ludzkiej	Technologia Chemiczna	2019/2020
<b>Opiekun naukowy</b>	magisterski	Elżbieta Jędraszko	Optymalizacja metody identyfikacji białek oddziałujących z nanocząstkami Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> w surowicy krwi ludzkiej	Technologia Chemiczna	2019/2020
<b>Kierujący pracą</b>	inżynierski	Agata Alberska	Badanie oddziaływań nanocząstek Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ze składnikami surowicy krwi ludzkiej za pomocą techniki HPLC-ICP-MS/MS	Biotechnologia	2019/2020
<b>Kierujący pracą</b>	inżynierski	Nina Gos	Optymalizacja metody HPLC-ICP-MS rozdzielania i oznaczania składników układu nanonośnik złota–lek przeciwnowotworowy	Technologia Chemiczna	2019/2020
<b>Opiekun naukowy</b>	inżynierski	Ewelina Kamińska	Optymalizacja metody CE–ICP–MS/MS badania oddziaływań magnetycznych nanocząstek Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ze składnikami surowicy krwi ludzkiej	Technologia Chemiczna	2019/2020
<b>Kierujący pracą</b>	magisterski	Anna Wróblewska	Charakterystyka tworzenia połączeń nanonośnik–cisplatyna za pomocą techniki CE-ICP-MS	Biotechnologia	2018/2019
<b>Opiekun naukowy</b>	magisterski	Marta Rydzy	Oznaczanie nanocząstek Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> za pomocą techniki CE-ICP-QqQ-MS	Technologia Chemiczna	2018/2019

<b>Kierujący pracą</b>	inżynierski	Aleksandra Milewska	Opracowanie metody identyfikacji białek oddziałujących z formami złota w komórkach nowotworowych po pobraniu nanocząstek złota	Technologia Chemiczna	2018/2019
<b>Opiekun naukowy</b>	inżynierski	Katarzyna Mikołajczyk	Zastosowanie technik łączonych do badania przemian kropek kwantowych w komórkach nowotworowych	Technologia Chemiczna	2018/2019
<b>Opiekun naukowy</b>	magisterski	Agnieszka Zuba	Analiza specjacyjna metalonanomateriałów terapeutyczno-diagnostycznych w cytozolu komórek nowotworowych	Technologia Chemiczna	2017/2018
<b>Kierujący pracą</b>	inżynierski	Paulina Popielarczyk	Optymalizacja metody CE-ICP-MS badania oddziaływań nowotworowo ukierunkowanych metalonanomateriałów ze składnikami cytozolu komórek nowotworowych	Technologia Chemiczna	2017/2018
<b>Opiekun naukowy</b>	magisterski	Agnieszka Kur	Opracowanie metody ICP-MS oznaczania stopnia pobierania metalonanomateriałów terapeutyczno-diagnostycznych i ich usytuowania w przedziałach komórek nowotworowych	Biotechnologia	2016/2017
<b>Opiekun naukowy</b>	inżynierski	Paulina Pisarek	Zastosowanie techniki CE-ICP-MS do badania oddziaływań nowotworowo ukierunkowanych metalonanomateriałów z białkami surowicy krwi ludzkiej	Technologia Chemiczna	2015/2016
<b>Opiekun naukowy</b>	magisterski	Joanna Legat	Charakteryzowanie parametrów powinowactwa nowotworowo ukierunkowanych metalonanomateriałów do białek surowicy krwi ludzkiej, za pomocą techniki sprzężonej CE-ICP-MS	Biotechnologia	2014/2015
<b>Opiekun naukowy</b>	inżynierski	Karolina Anecka	Opracowanie metody CE-ICP MS badania oddziaływań nowotworowo ukierunkowanych nanocząstek z białkami transportującymi występującymi w surowicy krwi ludzkiej	Technologia Chemiczna	2014/2015
<b>Opiekun naukowy</b>	inżynierski	Katarzyna Dobrowolska	Opracowanie metodyki badania parametrów powinowactwa nowotworowo ukierunkowanych nanomateriałów do białek surowicy krwi	Biotechnologia	2014/2015

<b>Opiekun naukowy</b>	inżynierski	Joanna Legat	Badanie transportu potencjalnego rutenowego leku przeciwnowotworowego w obrębie cytozolu komórki nowotworowej z zastosowaniem technik sprzężonych	Biotechnologia	2013/2014
<b>Opiekun naukowy</b>	magisterski	Monika Prządka	Badanie mechanizmu transportu kompleksu rutenu KP1019 w symulowanych warunkach cytozolu komórki nowotworowej z wykorzystaniem między innymi map peptydowych	Technologia Chemiczna	2012/2013
<b>Opiekun naukowy</b>	inżynierski	Lidia Fornal	Zastosowanie techniki sprzężonej CE–ICP MS do badania mechanizmu transportu kompleksu rutenu KP1019 w symulowanych warunkach cytozolu komórki nowotworowej	Technologia Chemiczna	2012/2013
<b>Opiekun naukowy</b>	inżynierski	Anna Osińska	Opracowanie metody rozdzielania, identyfikacji i oznaczania składników wód toaletowych i perfumowanych za pomocą chromatografii gazowej	Technologia Chemiczna	2012/2013

## 6.2. Osiągnięcia organizacyjne i popularyzujące naukę

W roku 2019 byłam członkiem komitetu organizacyjnego międzynarodowej konferencji 7<sup>th</sup> International Symposium on Metallomics organizowanej w Politechnice Warszawskiej, a w roku 2013 zajmowałam się koordynowaniem pracy doktorantów Politechniki Warszawskiej i Uniwersytetu Warszawskiego, zaangażowanych w przygotowanie międzynarodowej Konferencji 17<sup>th</sup> European Conference on Analytical Chemistry.

Pełnię obecnie funkcję członka bez stopnia doktora habilitowanego Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne w Politechnice Warszawskiej.

Osiągnięcia popularyzujące naukę:

- Uczestnictwo w programie wolontariatu naukowego organizowanego na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej wspierającego rozpoczynanie pracy badawczej studentów na wczesnych etapach studiów I stopnia (od 2017 roku);
- Prowadzenie zajęć laboratoryjnych w ramach praktyk zawodowych uczniów Zespołu Szkół Nr 21 w Warszawie (od 2019);
- Prowadzenie zajęć w języku polskim i angielskim w ramach kursu specjalistycznego „HPLC i techniki sprzężone”, będącego częścią projektu „Program rozwoju kompetencji studentów wydziałów przyrodniczych Uniwersytetu Warszawskiego

i Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej” finansowanego w ramach inicjatywy Wiedza Edukacja Rozwój Europejskiego Funduszu Społecznego (2017-2019);

- Wygłoszenie wykładu „Pobieranie próbek w chemii analitycznej” dla uczniów Zespołu Szkół Chemicznych z Włocławka (2018);
- Wygłoszenie wykładu „Mój wybór – uczelnia techniczna. O możliwościach na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej” dla uczniów klasy III o profilu biologiczno-chemicznym II Liceum Ogólnokształcącego we Włodawie (2014).

## **7. Inne informacje, ważne z punktu widzenia wnioskodawcy, a dotyczące jego kariery zawodowej.**

### **7.1. Wykaz międzynarodowych i krajowych nagród i wyróżnień naukowych**

- *za osiągnięcia naukowe*
  - Międzynarodowa nagroda za wybitne osiągnięcia w dziedzinie technik spektroskopowych: European Rising Star Award for Plasma Spectrochemistry; Pau, Francja, 2019
  - Stypendium Ministra Edukacji i Nauki dla wybitnych młodych naukowców, 2021-2024
  - Nagroda za najlepszą rozprawę doktorską w 2015 roku z dziedziny spektrometrii mas, przyznana przez Komitet Chemii Analitycznej Polskiej Akademii Nauk
  - Grant dla młodych naukowców w ramach XL Colloquium Spectroscopicum Internationale; Piza, Włochy
  - Nagrody II stopnia JM Rektora Politechniki Warszawskiej za osiągnięcia naukowe w latach 2014 i 2015/2016 – zespołowo
  - Wyróżnienie rozprawy doktorskiej zatytułowanej „Development of the analytical methodology for investigations of the anticancer metallocomplexes transportation under simulated physiological conditions” prze Radę Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej, 2015
  - Stypendium w ramach programu Międzynarodowe Projekty Doktoranckie Fundacji na rzecz Nauki Polskiej MPD/2010/4; Politechnika Warszawska, Wydział Chemiczny, 2011-2015
  - Stypendium naukowe „Programu Rozwojowego Politechniki Warszawskiej” przyznane w ramach konkursu CAS/29/POKL, 2013



- Specjalne stypendium naukowe Warszawskiego Akademickiego Konsorcjum Chemicznego, realizującego program KNOW, za wybitne osiągnięcia naukowe w roku akademickim 2012/2013
- Stypendium dla najlepszych doktorantów Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej za osiągnięcia naukowe w roku akademickim 2010/2011, 2011/2012, 2012/2013, 2013/2014
- *we współautorstwie publikacji*
  - Analytica Chimica Acta (2019, 1052, 1-9) publikacja wyróżniona jako "Feature article" i umieszczona na okładce woluminu
  - Metallomics (2015, 7, 1364-1370) publikacja wyróżniona jako "Hot papers"
- *za najlepsze prezentacje plakatowe na międzynarodowych konferencjach*
  - 22<sup>nd</sup> International Symposium on Separation Sciences (2016)
  - 17<sup>th</sup> European Conference on Analytical Chemistry (2013)
  - 29<sup>th</sup> International Symposium on Chromatography (2012)

Magdalena Matczuk

(podpis wnioskodawcy)