

# **Załącznik 1a**

## **Autoreferat**

---

**Kamilla Małek**

---

Kraków 2015

## Spis treści

1. Dane osobowe.....	3
2. Dyplomy i stopnie naukowe .....	3
3. Dotychczasowe zatrudnienie .....	3
4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.) .....	4
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego .....	4
4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego .....	4
4.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania .....	7
4.3.1. Wprowadzenie .....	7
4.3.2. Cel badań i omówienie najważniejszych wyników .....	8
4.3.3. Podsumowanie – najważniejsze osiągnięcia i elementy nowości naukowej .....	18
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych .....	19
6. Podsumowanie najważniejszych aspektów aktywności naukowej, dydaktycznej i organizacyjnej.....	23

## 1. Dane osobowe

Imię i Nazwisko: **Kamilla Małek**

## 2. Dyplomy i stopnie naukowe

wrzesień 2003                      Stopień **doktora nauk chemicznych** uzyskany na podstawie pracy doktorskiej pt. *Zastosowanie metod spektroskopii molekularnej do wyznaczania struktur oksymów i ich związków kompleksowych z jonami Ni(II) i Cu(II)*, promotor: prof. dr hab. Leonard M. Proniewicz, Zakład Fizyki Chemicznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

czerwiec 1998                      Tytuł zawodowy **magistra chemii** na podstawie pracy magisterskiej pt. *Wpływ pola elektrycznego na widma absorpcyjne domieszek śladowych w kryształach molekularnych*, promotor: prof. dr hab. Piotr Petelenz, Zakład Chemii Teoretycznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

## 3. Dotychczasowe zatrudnienie

**Miejsce zatrudnienia:** Uniwersytet Jagielloński w Krakowie (UJ), Wydział Chemii, Zakład Fizyki Chemicznej, Zespół Obrazowania Ramanowskiego, ul. Ingardena 3, 30-060 Kraków

### Zajmowane stanowiska:

lipiec 2010 – do chwili obecnej	adiunkt, Jagiellońskie Centrum Rozwoju Leków, UJ
październik 2006 – do chwili obecnej	adiunkt, Wydział Chemii, UJ
październik 2003 – wrzesień 2006	asystent, Wydział Chemii, UJ
październik 1998 – wrzesień 2003	doktorant, Wydział Chemii, UJ
ponadto:	
grudzień 2004 – czerwiec 2009	nauczyciel chemii programu International Baccalaureate (IB) w języku angielskim, International Baccalaureate School No. 1526, Kolegium Europejskie, Kraków
styczeń 2001 – maj 2002	doktorant i asystent dydaktyczny, Department of Chemistry and Center for Chemical Physics, University of Florida, Gainesville, USA

#### 4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)

##### 4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Wzmocniona powierzchniowo spektroskopia rozproszenia ramanowskiego (SERS) w badaniach biomedycznych.

##### 4.2. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

Jako podstawę habilitacji wybrałam cykl 10 pełnotekstowych artykułów opublikowanych w latach 2011-2015 w czasopismach recenzowanych o zasięgu międzynarodowym. Wkład pozostałych Autorów został określony w stosownych oświadczeniach (Zał. 4).

Sumaryczny Impact Factor dla tych prac wg roku wydania: 28,256

We wszystkich pracach jestem autorem korespondencyjnym.

Prace **H3**, **H5**, **H6** i **H8** powstały na podstawie prac magisterskich, w których byłam promotorem.

**H1. K. Małek\***, M. Makowski, A. Królikowska, J. Bukowska, *Comparative studies on IR, Raman, and surface enhanced Raman scattering spectroscopy of dipeptides containing  $\Delta$ Ala and  $\Delta$ Phe*, Journal of Physical Chemistry B, (2012) **116**: 1414-1425.

IF<sub>2012</sub>=3,607

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu celów badawczych, zaplanowaniu doświadczeń, wykonaniu doświadczeń polegających na wykonaniu obliczeń DFT, pomiarze widm FTIR i normalnego rozproszenia ramanowskiego i współudziale przy pomiarze widm SERS, których wyniki zamieszczone zostały na wszystkich rysunkach, analizie wyników badań, współpracy przy interpretacji wyników, napisaniu wstępnej wersji manuskryptu, korespondencji z edytorem czasopisma i współpracy przy korekcie manuskryptu wg otrzymanych recenzji. Mój udział procentowy szacuję na 50%.

**H2. K. Małek\***, A. Królikowska, J. Bukowska, *pH and substrate effect on adsorption of peptides containing Z and E dehydrophenylalanine. Surface-enhanced Raman spectroscopy studies on Ag nanocolloids and electrodes*, Journal of Physical Chemistry B, (2014) **118**: 4025-4036.

IF<sub>2013</sub>: 3,377

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu celów badawczych, zaplanowaniu doświadczeń, wykonaniu doświadczeń polegających na wykonaniu obliczeń DFT, pomiarze widm FTIR normalnego rozproszenia ramanowskiego i współudziale przy pomiarze widm SERS, których wyniki zamieszczone zostały na wszystkich rysunkach, analizie wyników badań, współpracy przy interpretacji wyników, napisaniu wstępnej wersji manuskryptu, korespondencji z edytorem czasopisma i współpracy przy korekcie manuskryptu wg otrzymanych recenzji. Mój udział procentowy szacuję na 60%.

**H3.** M. Gackowski, **K. Malek\***, *Surface-enhanced Raman spectroscopy of tridehydropeptides adsorbed on silver electrode*, Journal of Molecular Structure, (2014) **1065-1066**: 143-149.

IF<sub>2013</sub>: 1,599

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu celów badawczych, zaplanowaniu doświadczeń i nadzorowaniu ich wykonania, końcowej analizie wyników badań i interpretacji wyników, napisaniu manuskryptu, korespondencji z edytorem czasopisma i korekcie manuskryptu wg otrzymanych recenzji. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

**H4.** **K. Malek\***, M. Makowski, *The infrared and Raman spectra of solid tridehydropeptides: Influence of  $\Delta$ Ala and  $\Delta$ Phe on the spectral profile*, Vibrational Spectroscopy, (2012) **60**: 73-78.

IF<sub>2012</sub>=1,747

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu celów badawczych, zaplanowaniu doświadczeń, wykonaniu pomiarów, analizie i interpretacji wyników, napisaniu manuskryptu, korespondencji z edytorem czasopisma i korekcie manuskryptu wg otrzymanych recenzji. Mój udział procentowy szacuję na 85%.

**H5.** A. Jaworska, **K. Malek\***, *A comparison between adsorption mechanism of tricyclic antidepressants on silver nanoparticles and binding modes on receptors. Surface-enhanced Raman spectroscopy studies*, Journal of Colloid and Interface Science, (2014) **431**: 117-124.

IF<sub>2013</sub>: 3,552

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu celów badawczych, zaplanowaniu doświadczeń i nadzorowaniu ich wykonania, sposobu analizy wyników badań, współdziałanie przy analizie wyników, interpretacji wyników, napisaniu końcowej wersji manuskryptu, korespondencji z edytorem czasopisma i korekcie manuskryptu wg otrzymanych recenzji. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

**H6.**A. Jaworska, R. Wietecha-Posluszny, M. Wozniakiewicz, P. Koscielniak, **K. Malek\***, *Evaluation of the potential of surface enhancement Raman spectroscopy for detection of tricyclic psychotropic drugs. Case studies on imipramine and its metabolite*, Analyst, (2011) **136**: 4704-4709.

IF<sub>2011</sub>=4,230

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu celów badawczych, współdziałanie w zaplanowaniu doświadczeń i nadzorowaniu ich wykonania, w analizie wyników badań, interpretacji wyników, współpracy przy przygotowaniu manuskryptu, korespondencji z edytorem czasopisma i współpracy przy korekcie manuskryptu wg otrzymanych recenzji. Mój udział procentowy szacuję na 40%.

**H7. K. Malek\***, A. Brzózka, A. Rygula, G.D. Sulka\*, *SERS imaging of silver coated nanostructured Al and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> substrates. The effect of nanostructure*, Journal of Raman Spectroscopy, (2014) **45**: 281-291.

IF<sub>2013</sub>: 2,519

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale przy sformułowaniu celów badawczych, zaplanowaniu doświadczeń dotyczących pomiarów SERS i AFM, wykonaniu pomiarów SERS, analizie wyników badań dotyczących SERS i AFM, interpretacji wyników, współpracy przy przygotowaniu manuskryptu, korespondencji z edytorem czasopisma i współpracy przy korekcie manuskryptu wg otrzymanych recenzji. Mój udział procentowy szacuję na 45%.

**H8.K. Malek\***, A. Jaworska, P. Krala, N. Kachamakova-Trojanowska, M. Baranska, *Imaging of macrophages by surface enhanced Raman spectroscopy (SERS)*, Biomedical Spectroscopy and Imaging, IOS Press, (2013) **2**: 349-357.

IF: 0

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na sformułowaniu celów badawczych, zaplanowaniu doświadczeń i nadzorze ich wykonania, końcowej analizie wyników badań i interpretacji wyników, współpracy przy napisaniu manuskryptu, korespondencji z edytorem czasopisma i korekcie manuskryptu wg otrzymanych recenzji. Mój udział procentowy szacuję na 45%.

**H9.** A. Jaworska, T. Wojcik, **K. Malek\***, U. Kwolek, M. Kepczynski, A.A. Ansary, S. Chlopicki, M. Baranska, *Rhodamine 6G conjugated to gold nanoparticles as labels for both SERS and fluorescence studies on live endothelial cells*, Microchimica Acta, (2015) **182**: 119-127.

IF<sub>2013</sub>: 3,719

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale przy sformułowaniu celów badawczych, zaplanowaniu doświadczeń, współpracy przy analizie i interpretacji wyników badań, współpracy przy przygotowaniu manuskryptu, korespondencji z edytorem czasopisma i współpracy przy korekcie manuskryptu wg otrzymanych recenzji. Mój udział procentowy szacuję na 30%.

**H10.** A. Jaworska, L.E. Jamieson, **K. Malek\***, C.J. Campbell, J. Choo, S. Chlopicki, M. Baranska, *SERS-based monitoring of the intracellular pH in endothelial cells: the influence of the extracellular environment and tumour necrosis factor- $\alpha$* , Analyst, 2014, DOI: 10.1039/c4an01988a.

IF<sub>2013</sub> = 3,906

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współudziale przy sformułowaniu celów badawczych, zaplanowaniu doświadczeń i nadzorze ich wykonania, współpracy przy analizie i interpretacji wyników badań, współpracy przy przygotowaniu manuskryptu, korespondencji z edytorem czasopisma i współpracy przy korekcie manuskryptu wg otrzymanych recenzji. Mój udział procentowy szacuję na 30%.

### 4.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

#### 4.3.1. Wprowadzenie

Badania biomedyczne z zastosowaniem wzmocnionej powierzchniowo spektroskopii rozproszenia ramanowskiego (SERS) skupiają się zasadniczo na dwóch aspektach: 1/ fizykochemicznym, w którym określa się sposób oddziaływania cząsteczek o funkcji biologicznej lub farmakologicznej z podłożem metalicznym (powierzchnią srebra lub złota) oraz 2/ aspekcie analitycznym zarówno pod kątem identyfikacji danego analitu jak i jego ilości.

Bez znajomości określenia sposobu adsorpcji badanej cząsteczki na odpowiednim podłożu metalicznym trudno weryfikować stosowalność techniki SERS w aspekcie bio/analitycznym. Należy pamiętać, że w sposobie oddziaływania molekuly z powierzchnią metaliczną dwa typy mechanizmów odgrywają rolę: elektromagnetyczny i chemiczny. Pierwszy z nich wynika ze wzbudzenia powierzchniowych plazmonów metalu dających dodatkowe wzmocnienie pola elektromagnetycznego molekułom znajdujących się pewnej odległości od metalu. Z kolei, efekt chemiczny wynika z przeniesienia ładunku pomiędzy zaadsorbowanym analitem a powierzchnią metalu. Pomimo faktu, że teoretyczne zrozumienie mechanizmu powierzchniowego wzmocnienia nie jest w pełni opracowane<sup>1</sup>, szereg badań opublikowanych dotychczas, jasno wskazuje, że SERS jest techniką wystarczająco czułą do prowadzenia interdyscyplinarnych badań z zakresu chemii powierzchni, biofizyki, biochemii i biomedycyny.<sup>2,3,4</sup> Badania tego rodzaju prowadzone są od wielu lat i nadal istnieje szerokie spektrum zagadnień, które albo nie były poddawane weryfikacji eksperymentalnej albo uzyskane wyniki nadal wymagają doprecyzowania i wyjaśnienia, tak aby pogłębić wiedzę na temat trzech podstawowych problemów techniki SERS: 1/ mechanizmu wzmocnienia sygnału biomolekuł, 2/ rodzaju podłoża metalicznego aktywnego we wzmocnieniu powierzchniowym i ostatecznie 3/ zastosowanie tej techniki do badań układów biologicznych.

Obserwacja ta stała się motywacją podjętych przeze mnie badań. Głównym celem było zastosowanie w kontekście badań biomedycznych wzmocnionej powierzchniowo spektroskopii rozproszenia ramanowskiego (SERS) pod kątem 1/ określenia sposobu adsorpcji związków o udokumentowanym działaniu farmakologicznym poprzez zbadanie ich oddziaływania z powierzchnią metalu, 2/ badania aktywności różnych podłoży metalicznych we wzmocnieniu sygnału analitu wraz z określeniem potencjału techniki SERS dla detekcji analitu w materiale biologicznym oraz 3/ oceny informacji chemicznej jaką można uzyskać w badaniach *in vitro*. Zagadnienia te są osadzone w nurcie intensywnych badań nad wprowadzeniem techniki SERS jako komplementarnego narzędzia w badaniach o charakterze farmakologicznym i medycznym. Wyniki badań, które zostały omówione w niniejszym autoreferacie zostały przedstawione jako cykl 10 publikacji, stanowiących podstawę mojej rozprawy habilitacyjnej zatytułowanej: **Wzmocniona powierzchniowo spektroskopia rozproszenia**

<sup>1</sup> J.R. Lombardi, R.L. Birke, *A unified view of surface-enhanced Raman scattering*, Acc. Chem. Res., (2009) **42**: 734-742; J.R. Lombardi, R.L. Birke, *The theory of surface-enhanced Raman scattering*, J. Chem. Phys., (2012) **136**: 144704.

<sup>2</sup> M. Baia, S. Astilean, T. Iliescu, *Raman and SERS investigations of pharmaceuticals*, 2008, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.

<sup>3</sup> S. Schlücker, *Surface enhanced Raman spectroscopy. Analytical, biophysical and life science applications*, 2011, Wiley-VCH, Weinheim, Germany.

<sup>4</sup> K. Hering, D. Cialla, K. Ackermann, T. Dörfer, R. Möller, H. Schneidewind, R. Mattheis, W. Fritzsche, P. Rösch, J. Popp, *SERS: a versatile tool in chemical and biochemical diagnostics*, Anal. Bioanal. Chem., (2008) **390**: 113-124.

**ramanowskiego (SERS) w badaniach biomedycznych.** Niniejsze opracowanie nie zawiera szczegółowego omówienia wszystkich wyników (znajduje się ono w tekstach załączonych publikacji), lecz stanowi przegląd przeprowadzonych badań oraz najważniejsze, sformułowane na ich podstawie wnioski.

#### 4.3.2. Cel badań i omówienie najważniejszych wyników

1/ Określenie sposobu adsorpcji związków o udokumentowanym działaniu farmakologicznym poprzez zbadanie oddziaływania nanocząstek metalu z modelowymi układami:

W swojej pracy podjęłam badania zmierzające do określenia oddziaływań z powierzchnią metalu modelowych naturalnie występujących, niekodowanych pochodnych aminokwasów - dehydroaminokwasów, które są zmodyfikowane do formy nienasyconej poprzez wprowadzenie podwójnego wiązania pomiędzy atomami węgla  $C_\alpha$  i  $C_\beta$ . Taka zamiana tetraedrycznej struktury wokół atomu  $C_\alpha$  do trygonalnej indukuje zawadę steryczną i w konsekwencji zmienia strukturę drugorzędową dehydropeptydów w porównaniu z odpowiednimi kodowanymi peptydami. Najczęściej występującymi dehydroaminokwasami są dehydroalanina ( $\Delta$ Ala) i dehydrofenyloalanina ( $\Delta$ Phe). Ta ostatnia występuje dwóch formach izomerycznych,  $Z$  i  $E$  ( $\Delta^{(Z)}$ Phe/ $\Delta^{(E)}$ Phe). Izomer  $E$  jest mniej stabilny termodynamicznie. W literaturze spotyka się w większości badania dotyczące  $\Delta^{(Z)}$ Phe. Zainteresowanie tą klasą peptydów wynika z ich farmakologicznego i fizjologicznego działania oraz występowania w wielu biopeptydach, np. opioidach, tyreoliberynie, czy bradykininie oraz penicylinach, cefalosporynach i gramicydynie.<sup>5</sup> Peptydy zawierające dehydroaminokwasy były badane ze względu na ich inhibitoryczne działanie względem nikotynowych receptorów cholinowych, ludzkiej acetylocholinazy czy butyrylocholinazy. Tu, modelowanie molekularne wskazuje na blokowanie tyrozyny, tryptofanu czy też seryny poprzez pierścień fenyłowy dehydrofenyloalaniny.<sup>6</sup> Dehydroalanina w nizinie inhibuje wzrost sporów bakteryjnych poprzez reakcję z grupami sulfhydryłowymi znajdującymi się w błonie komórkowej.<sup>7</sup> Wykazano również, iż peptydy zawierające resztę  $\Delta$ Phe jak i  $\Delta$ Ala działają jako substraty katepsyny C odpowiedzialnej za takie schorzenia jak dystrofia mięśniowa, artretyzm reumatoidalny czy rak podstawnkomórkowy skóry.<sup>8</sup> Ich działanie jest ściśle powiązane z rodzajem konformacji wymuszanej przez obecność poszczególnych dehydroaminokwasów. Izomery  $E$  i  $Z$  dehydrofenyloalaniny często są wykorzystywane jako sonda topograficzna dla określenia lokalnych oddziaływań ligand – receptor, w których receptor białkowy precyzyjnie uprzywilejuje którąś z form. Na przykład, litoryna z  $\Delta^{(Z)}$ Phe jest antagonistą, podczas gdy litoryna z  $\Delta^{(E)}$ Phe działa jak agonista.<sup>9</sup>

<sup>5</sup> S.F. Nandel, R. Jaswal, *New type of helix and 2<sub>7</sub> ribbon structure formation in poly  $\Delta$ Leu peptides: Construction of a single-handed template*, Biomacromolecules, (2007) **8**: 3093-3101; K. Hamada, S. Shinoda, H. Oku, K. Komagoe, T. Katsu, R. Katakai, *Synthesis of low-hemolytic antimicrobial dehydropeptides based on gramicidin S*, J. Med. Chem., (2006) **49**: 7592-7595.

<sup>6</sup> H.A. Grigoryan, A.A. Hambardzumyan, M.V. Mkrtchyan, V.O. Topuzyan, G.P. Halebyan, R.S. Asatryan,  *$\alpha,\beta$ -Dehydrophenylalanine choline esters, a new class of reversible inhibitors of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase*, Chem. Biol. Interactions, (2008) **171**: 108-116.

<sup>7</sup> L.D. Kluskens, A. Kuipers, R. Rink, E. de Boef, S. Fekken, A.J.M. Driessen, O.P. Kuipers, G.N. Moll, *Post-translational modification of therapeutic peptides by NisB, the dehydratase of the lantibiotic nisin*, Biochemistry, (2005) **44**: 12827-12834.

<sup>8</sup> M. Makowski, M. Pawelczak, R. Latajka, K. Nowak, P. Kafarski, *Synthesis of tetrapeptide *p*-nitrophenylanilides containing dehydroalanine and dehydrophenylalanine and their influence on cathepsin C activity*, J. Peptide Sci., (2001) **7**: 141-145.

<sup>9</sup> H.I. Mosberg, R.K. Dua, I.D. Pogozheva, A.L. Lomize, *Development of a model for the delta-opioid receptor pharmacophore. 4. Residue 3 dehydrophenylalanine analogues of Tyr-c[D-Cys-Phe-D-Pen]OH (JOM-13) confirm required gauche orientation of aromatic side chain*, Biopolymers, (1996) **39**: 287-296.



Bazując na tak szerokim zainteresowaniu pod kątem farmakologicznym i biologicznym, podjęłam się określenia relacji pomiędzy strukturą dehydropeptydów i ich sposobem adsorpcji na powierzchni metalicznej stosując spektroskopię SERS, tym bardziej, że w literaturze brak było opisu widm SERS tej grupy peptydów. Dodatkowo badania te były uzupełnione korelacją struktury molekularnej z charakterystyką spektralną zarejestrowaną w widmach FTIR i normalnego efektu ramanowskiego ze szczególnym uwzględnieniem struktury drugorzędowej peptydów. Ponadto, dla dehydropeptydów posiadających grupę funkcyjną ulegającą deprotonacji, badałam również wpływ pH na mechanizm adsorpcji. W swoich badaniach uwzględniłam serię di- i tridehydropeptydów o ogólnej budowie Gly-X i Gly-X-Gly, gdzie X:  $\Delta$ Ala,  $\Delta^{(Z)}$ Phe i  $\Delta^{(E)}$ Phe. Dodatkowo terminalne reszty aminokwasowe były zablokowane dla niektórych peptydów grupą tert-butyloksykarbonylową (Boc) czy grupą estru metylowego (OMe). Wybór takich związków był podyktowany potrzebą systematycznych badań jak reszta dehydroaminokwasowa i jej bezpośrednie otoczenie wpływa na zmianę struktury molekularnej i w konsekwencji na sposób adsorpcji. Badałam oddziaływanie tych związków ze schropowaconymi elektrodami i koloidalnymi nanocząstkami srebra i złota, ale ze względu na słabe oddziaływanie ze złotem, ostateczną analizę przeprowadziłam dla powierzchni srebra. Widma SERS zarejestrowano przy współpracy z Zespołem Prof. dr hab. J. Bukowskiej z Uniwersytetu Warszawskiego (Wydział Chemii). Wyniki zebrałam w publikacjach **H1-H4** i były one rezultatem projektu Nr 4 (Zał. 2a) finansowanego przez MNiSzW, którego byłam kierownikiem.

W pierwszym kroku (**H1**) określiłam sposób adsorpcji didehydropeptydów z serii: Boc-Gly-X, gdzie X:  $\Delta$ Ala,  $\Delta^{(Z)}$ Phe i  $\Delta^{(E)}$ Phe używając jako podłoża metalicznych koloidalnych nanocząstek srebra. Badania te były wsparte szczegółową analizą strukturalną na podstawie eksperymentalnych i teoretycznych (metodą DFT) widm FTIR i normalnego efektu ramanowskiego. Wskazały one na obecność silnego efektu rezonansowego pomiędzy układem  $\pi$ -elektronowym wiązania  $C_{\alpha}=C_{\beta}$ , amidowego i pierścienia fenyloвого, dla pochodnych z dehydrofenyloalaniną, determinując konformację wokół wiązania amidowego w układzie Gly-X. Analiza ta znalazła potem zastosowanie w badaniach spektroskopowych tripeptydów bez konieczności stosowania czasochłonnych obliczeń kwantowo-chemicznych, co opublikowano w pracy **H4**. Była ona również wykorzystana w opisie widm SERS. Do ich rejestracji wymagane było użycie roztworu o zasadowym pH, przekraczającym znacznie stałą protonacji związków, co oznaczało, że efektywne oddziaływanie z powierzchnią srebra zachodzi głównie poprzez terminalny jon karboksylowy. Taki mechanizm adsorpcji potwierdziły widma SERS. Postać i położenie pasm markerowych dla grupy  $COO^{-}$  wskazały różnice dla każdej z badanych pochodnych. Jon karboksylowy w peptydzie z resztą  $\Delta$ Ala przyjmuje pozycję zgiętą ale jednolitą i wzmocnienie pasm tej grupy wykazuje duży wkład mechanizmu z przeniesieniem ładunku. Ponadto, wymusza również zmiany w konformacji dipeptydu na skutek oddziaływania z powierzchnią metalu wiązania peptydowego pomiędzy Gly i  $\Delta$ Ala. Z kolei dla peptydów z oboma izomerami  $\Delta$ Phe, zjonizowana grupa karboksylowa przyjmuje pozycję bardziej prostopadłą dla izomeru E niż dla Z i to oddziaływanie jest silniejsze dla  $\Delta^{(E)}$ Phe niż  $\Delta^{(Z)}$ Phe. Układ  $>C=C-Ph$  również bierze udział w oddziaływaniu w nanocząstkami srebra, a w przeciwieństwie do peptydu z dehydroalaniną nie obserwuje się znaczących zmian w konformacji molekuł z dehydrofenyloalaniną. W kolejnej pracy (**H2**) skupiłam się na układach modelowych posiadających w swojej budowie oba izomery  $\Delta$ Phe (Gly- $\Delta$ Phe i Gly- $\Delta$ Phe-Gly) i na ich mechanizmie adsorpcji uwzględniając fakt, że do molekuł wprowadzono dodatkowo potencjalne grup oddziaływania z metalem. Te badania uwzględniały również zmiany w protonacji N- i C-końca peptydów jak i rodzaj podłoża metalicznego (elektroda i zol). Rodzaj powierzchni metalu wpływa na mechanizm adsorpcji zmieniając siłę oddziaływania metal

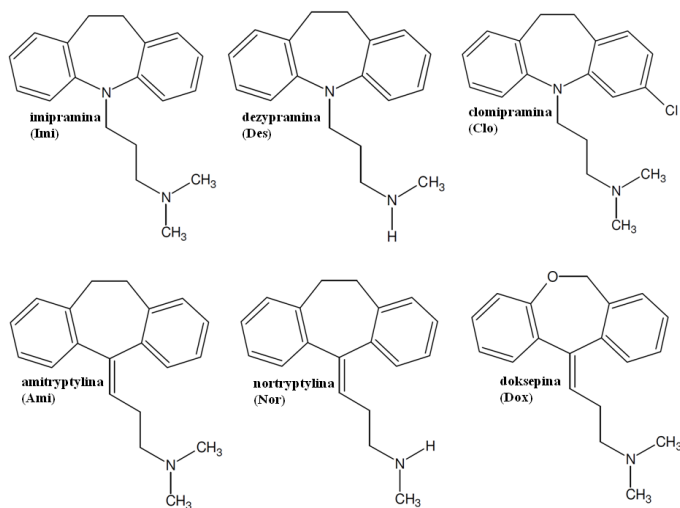
– cząsteczka jak i miejsce adsorpcji. Widma FTIR i normalnego efektu ramanowskiego wykazały, że peptydy z izomerem *E* charakteryzują się silniejszymi wiązaniami wodorowymi, w które zaangażowane są grupy peptydowe niż te z izomerem *Z* dehydrofenyloalaniny. Ponadto, scharakteryzowałam pasma markerowe w widmach ramanowskich dla obu izomerów oraz zauważyłam, że położenie pasma dla drgania wiązania  $C_{\alpha}=C_{\beta}$  jest zależne od struktury peptydu a nie rodzaju izomeru dehydrofenyloalaniny. Analiza widm SERS dla tych czterech pochodnych wykazała podobnie do dipeptydów typu Boc-Gly-X, iż głównym miejscem adsorpcji jest zjonizowana grupa karboksylowa i nawet jeśli nie występuje w takiej formie w obecności metalu, to powierzchnia elektrody i zolu srebra wymusza jej deprotonację. Jej orientacja względem podłoża jest zmienna od płaskiej do lekką pochyłej i jest czuła na kwasowość roztworu i strukturę molekularną dehydropeptydu. Silną preferencję do oddziaływania poprzez jon karboksylowy zauważono dla elektrody srebra, co należy wytłumaczyć dodatkowo naładowaną powierzchnią metalu i kulombowskim przyciąganiem przez nią anionu. Udział wiązania  $C_{\alpha}=C_{\beta}$  w adsorpcji jest silnie zależny od otaczających go reszt aminokwasowych w przeciwieństwie do serii dehydropeptydów Boc-Gly-X. Z kolei wzmocnienie drgań pierścienia fenyłowego i grupy N-końca jest preferowane dla dehydropeptydów posiadających izomer  $\Delta^{(Z)}$ Phe. Kontynuując badania tego typu peptydów, przeprowadziłam analizę strukturalną i mechanizmu adsorpcji tripeptydów o ogólnym wzorze Boc-Gly-X-Gly-Y, gdzie X to  $\Delta$ Ala,  $\Delta^{(Z/E)}$ Phe a Y: Boc, COOH stawiając pytanie jaką orientację na powierzchni metalu wymusi konformacja łańcucha peptydowego (określona w pracy **H3,H4**) oraz blokada C-końca przez grupę Boc. Szczegółowa dyskusja nad widmami SERS jest zawarta w pracy **H3**. Zaskakującym okazał się fakt, iż ta grupa związków jest aktywna w sensie wzmocnienia powierzchniowego na elektrodzie srebrnej ale nie na koloidalnych nanocząstkach srebra. W przypadku pochodnych z dehydroalaniną zarejestrowano jedynie SERS dla peptydu z wolnym C końcem w wyniku oddziaływania pochylonego do metalu jonu karboksylowego. Pozostała część łańcucha, tj. Boc-Gly-, charakteryzująca się  $\alpha$ -helikalną konformacją, jest ustawiona prostopadle do powierzchni, podczas gdy otoczona dwoma resztami glicyny dehydroalanina jest zgięta. Na skutek takiego oddziaływania struktura helikalna ulega pewnym deformacjom jak wskazują położenia pasm amidowych w widmach SERS i FTIR. Wprowadzenie do cząsteczki tripeptydu danego izomeru dehydrofenyloalaniny prowadzi do różnych właściwości spektralnych widocznych w widmach FTIR, ramanowskich jak i SERS. Analizując widma SERS dla peptydów zawierających  $\Delta^{(Z)}$ Phe, zauważyłam że dla Boc-Gly- $\Delta^{(Z)}$ Phe-Gly-OMe fragmentem oddziaływujących z powierzchnią metalu jest jedynie pierścień fenyłowy wyeksponowany poza główny szkielet molekuly a dla molekuly z wolnym C-końcem miejscami aktywnymi jest ułożony horyzontalnie jon karboksylowy i prostopadle ustawiony pierścień fenyłowy. Dodatkowo, tu również dla obu związków, istnieje oddziaływanie szkieletu peptydowego ze schropowaconą elektrodą srebrną jak wskazały pasma w widmach SERS przypisane do drgań amidowych. Zastąpienie izomeru *Z* dehydrofenyloalaniny izomerem *E* prowadzi do wzmocnienia jedynie drgań grupy styrylowej ustawionej prostopadle do metalu dla peptydu zablokowanego na N- i C-końcu a lekko pochyłej dla pochodnej z wolnym C-końcem. Dla tego ostatniego nie zaobserwowano oddziaływań metal – jon karboksylowy.

Podsumowując tę część badań, w pracach **H1-H4** opracowano sposób adsorpcji szeregu dehydropeptydów. W oddziaływaniu z zolem srebra, mechanizm elektromagnetyczny dominuje we wzmocnieniu SERS tej klasy peptydów, a wkład efektu z przeniesieniem ładunku jest charakterystyczny dla oddziaływania ze schropowaconą elektrodą srebrną. Pasma SERS pierścienia fenyłowego pojawiają się we wszystkich widmach SERS co odpowiada jego udziałowi w funkcjach

biologicznych, jak wspomniano we wstępie. Zauważono, że zmienia się ich intensywność względem wzmocnienia pasma przypisanego do drgań  $C_{\alpha}=C_{\beta}$ , wskazując na sprzężenie w grupie styrbenowej wynikające z wzajemnego przestrzennego ułożenia podwójnego wiązania C=C i pierścienia fenylogo. Wykazano również, iż grupa karboksylowa bierze również udział w oddziaływaniu z podłożem metalicznym. Wskazano pasma markerowe definiujące jej orientację płaska, pochyloną lub prostopadłą.

Biorąc pod uwagę przedstawiony powyżej aspekt związany z zastosowaniem techniki SERS do określenia mechanizmu adsorpcji substancji o funkcji biologicznej, zdałam sobie sprawę, że w literaturze brak jest bezpośredniego porównania sposobu adsorpcji danego leku na powierzchni

metalicznej określonej na podstawie widm SERS i oddziaływania tegoż leku z odpowiednim receptorem. Stąd, podjęłam badania, aby zweryfikować takie zastosowanie spektroskopii SERS na dobrze zdefiniowanym modelu. Do tego celu wybrałam sześć trójcyklicznych leków przeciwdepresyjnych (Rys. 1), których mechanizm oddziaływania z receptorem jest szeroko badany i dobrze poznany pod kątem farmakologicznym jak i strukturalnym.<sup>10</sup> Wyniki badań są szczegółowo opisane w pracy **H5**. Na podstawie stosunków pasm w widmach klasycznego rozproszenia ramanowskiego



Rys. 1. Wzory strukturalne badanych trójcyklicznych leków antydepresyjnych.

i tego wzmocnionego powierzchniowo na nanocząstkach srebra zaproponowałam sposób adsorpcji dla badanych leków wskazując, że nawet niewielka zmiana w budowie leku wpływa na identyfikowalne w widmach SERS zmiany w adsorpcji tych leków.

Widma SERS jednocześnie wskazały, iż głównym miejscem oddziaływania wszystkich leków jest  $\pi$ -elektronowy układ trójpierścieniowy i metylo-aminopropylowy łańcuch boczny, podobnie do dokowania się tych ligandów w układzie transporterów serotoniny i leucyny<sup>10</sup>, gdzie system pierścieniowy leku jest ułożony prawie prostopadle do płaszczyzny hydrofilowej kieszeni receptora. Aczkolwiek pozycja poszczególnych leków jest trochę odmienna a więc specyficzna dla każdego z nich. Zaproponowałam w pracy **H5**, że stosunki intensywności integralnych pasm pochodzących od drgania „oddychającego” (ang. breathing) pierścienia dibenzoazepinowego i od drgania  $\delta_a$  (rozciągające wiązania C=C) różnią się dla poszczególnych grup leków wskazując na różnice w orientacji układu pierścieni. Na przykład, dla grupy leków Imi, Des i Clo (Rys. 1) pierścień klomipraminy na skutek podstawienia atomem chloru jest mniej nachylony niż imipraminy i dezypraminy co potwierdza modelowanie molekularne<sup>10</sup>. Podobną orientację zaproponowałam dla

<sup>10</sup> S. Sinning, M. Musgaard, M. Jensen, K. Severinsen, L. Celik, H. Koldsø, T. Meyer, M. Bols, H.H. Jensen, B. Schiøtt, O. Wiborg, *Binding and orientation of tricyclic antidepressants within the central substrate site of the human serotonin transporter*, J. Biol. Chem. (2010) **285**: 8363-8374; S. Sarker, R. Weissensteiner, I. Steiner, H.H. Sitte, G.F. Ecker, M. Freissmuth, S. Susic, *The high-affinity binding site for tricyclic antidepressants resides in the outer vestibule of the serotonin transporter*, Mol. Pharm., (2010) **78**: 1026-1035; A. Penmatsa, K.H. Wang, E. Gouaux, *X-ray structure of dopamine transporter elucidates antidepressant mechanism*, Nature, (2013) **503**: 85-91; H. Wang, A. Goehring, K.H. Wang, A. Penmatsa, R. Ressler, E. Gouaux, *Structural basis for action by diverse antidepressants on biogenic amine transporters* Nature, (2013) **503**: 141-145.

nortryptyliny, co zgodne jest z faktem, że cząsteczki tego leku są zaklinowane pomiędzy membranowymi helisami transportera dopaminy<sup>10</sup>. Nie opracowano dotychczas w literaturze sposobu oddziaływania dla amitryptyliny i doksepiny, które wraz z nortryptyliną posiadają dodatkowo wiązanie C=C wbudowane w łańcuch boczny. Na podstawie widm SERS zaproponowałam marker spektralny, stosunek intensywności pasm pochodzących od trójpierścieniowego układu i wiązania C=C, który wskazał, że oddziaływanie Ami i Dox poprzez układ  $\pi$ -elektronowy jest silniejsze niż Nor a obecność atomu tlenu w doksepinie nie wywołuje znaczących zmian w sposobie adsorpcji, podobnie jak dla nortryptyliny. Zaproponowałam również sposób przestrzennego ułożenia łańcucha metyloaminopropylowego wskazując markery spektralne dla identyfikacji jego oddziaływania z nanocząstkami srebra. Dodatkowo, zauważyłam że adsorpcja leków jest zależna od obecności jonów chlorkowych. Ich nadmiar, powyżej stosunku molowego lek:Cl<sup>-</sup> = 1:1, osłabiał oddziaływanie cząsteczek badanych związków z powierzchnią metalu. Ta obserwacja jest zgodna z koncepcją stabilizowania dokowania tych leków przeciwdepresyjnych w receptorze poprzez jeden jon chlorkowy.<sup>10</sup> Praca ta wskazała, że spektroskopia SERS może być pomocna jako komplementarne narzędzie w badaniach farmakologicznych czy w modelowaniu molekularnym podając ogólny model oddziaływań ligand – receptor.

2/ Badania aktywności różnych podłoży metalicznych do wzmocnienia sygnału analitu wraz z określeniem potencjału techniki SERS dla detekcji analitu w materiale biologicznym:

Jednym z pytań, które powstało w trakcie moich badań z wykorzystaniem powierzchniowo wzmocnionej spektroskopii ramanowskiej było określenie jej potencjału jako techniki w analizie ilościowej. Jak wiadomo, jest to technika bardzo czuła, dająca możliwość identyfikacji analitów różniących się nieznacznymi różnicami strukturalnymi jak również dostarczająca możliwość ultraczułej detekcji. Ilościowa analiza z zastosowaniem SERS nadal wymaga weryfikacji, ponieważ wiele czynników wpływa na jakość uzyskanej odpowiedzi, np. rodzaj podłoża metalicznego i jego stabilność, rodzaj analitu i powtarzalność pomiaru. Nie jest to metoda, która weszła do laboratorium jako rutynowy sposób analizy. Aczkolwiek nadal jest podejmowanych wiele badań mając na uwadze zalety SERS skoro może to być technika szybka (w porównaniu np. z chromatografią) i niewymagająca zbyt wielu procedur przygotowania próbki do pomiaru.<sup>11</sup> Do tego celu wybrałam imipraminę i dezypraminę opisane powyżej ze względu na to, że szereg technik analitycznych zostało już przetestowanych w celu detekcji tej klasy farmaceutyków w badaniach toksykologicznych w próbkach osocza.<sup>12</sup> Ponadto, dezypramina również jest metabolitem imipraminy. W publikacji **H6** przedstawiłam podsumowanie tychże badań prowadzonych przy współpracy z Zespołem Prof. dr hab. P. Kościelniaka (Wydział Chemii UJ). Analogiczne wyniki uzyskano w pracy magisterskiej pani Mgr A. Jaworskiej, której byłam promotorem, dla pozostałych leków przeciwdepresyjnych przedstawionych na Rys. 1.<sup>13</sup> Jako cel postawiłam sobie zweryfikowanie następujących założeń: 1/ jaka jest odpowiedź spektralna leku i jego metabolitu w funkcji stężenia w widmach SERS w próbce biologicznej i czy 2/ wobec faktu że stosowane w diagnostyce medycznej techniki muszą wyekstrahować analit z materiału

<sup>11</sup> S.E.J. Bell, N.M.S. Sirimuthu, *Quantitative surface-enhanced Raman spectroscopy*, Chem. Soc. Rev., (2008) **37**: 1012-1024.

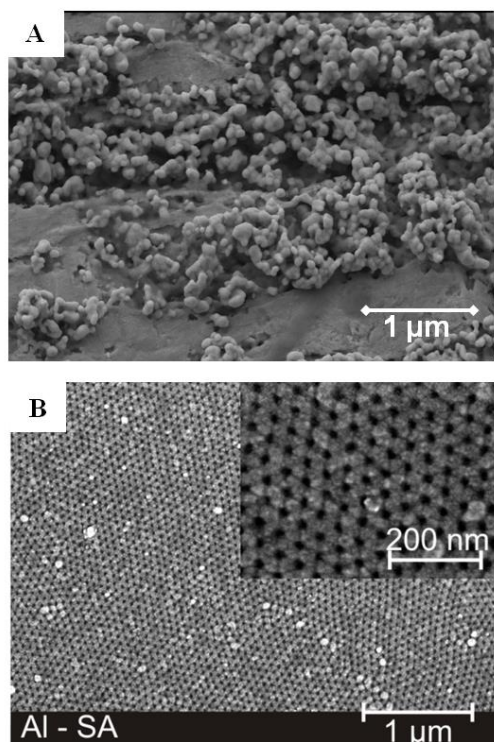
<sup>12</sup> K. Madej, P. Kościelniak, *Review of analytical methods for identification and determination of PHEs and tricyclic antidepressants*, Crit. Rev. Anal. Chem., (2008) **38**: 50-66.

<sup>13</sup> A. Jaworska, *Opracowanie metody analizy trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych metodą powierzchniowo wzmocnionej spektroskopii ramanowskiej (SERS)*, praca magisterska, UJ, Kraków, 2010.

biologicznego (jak np. w chromatografii), taka procedura jest wymagana do detekcji leku i jego metabolitu techniką SERS. Stosując standardowy protokół ekstrakcji do fazy stałej (SPE, ang. Solid-Phase Extraction) wyekstrahowano z osocza ludzkiego obie substancje i zarejestrowano widma SERS używając zolu srebra jako podłoża. Ten ostatni przygotowano w trzech różnych syntezach dających rozmiar nanocząstek srebra od 20 do 60 nm. Zauważono, że najsilniejsze wzmocnienie sygnału ramanowskiego obserwuje się dla nanocząstek srebra o rozmiarze 30-40 nm otrzymanych poprzez redukcję jonów srebra hydroksylaminą w środowisku zasadowym wskazując, że dobór podłoża metalicznego musi być indywidualny dla danego analitu. Rejestrując widma SERS w zależności od stężenia Imi i Des, zauważono że sygnał SERS Imi zanika przy stężeniu rzędu 1  $\mu\text{M}$  a jej metabolitu przy około 10  $\mu\text{M}$ . Izoterma Langmuira dla imipraminy wskazała, że wysycenie miejsc aktywnych na cząstkach metalu następuje przy dość wysokim stężeniu 25  $\mu\text{M}$ . Krzywa ta wskazała też dwa zakresy liniowej zależności pomiędzy intensywnością pasm markerowymi leku a jego stężeniem z bardzo dobrym dopasowaniem i możliwością detekcji imipraminy na poziomie jej działania toksycznego. Ze względu na to, że w procesie ekstrakcji analitu z osocza konieczna była rekonstrukcja próbki porównaliśmy intensywność sygnału SERS imipraminy i dezypraminy bezpośrednio w próbce osocza. Wykazaliśmy, że sygnał imipraminy jest prawie 10-krotnie wyższy dla próbki leku w osoczu niż dla próbki po ekstrakcji do fazy stałej, co wskazuje, że w dalszych pracach nad analitycznym oznaczaniem trójcyklicznych leków można skrócić czas analizy. Interesującym był fakt, że w przypadku dezypraminy intensywność markerów metabolitu Imi była wyższa dla próbek ekstrahowanych, co może wynikać z faktu zaobserwowanego w pracy **H5**, że usunięcie jednej grupy metylowej z łańcucha aminopropylowego w dezypraminie powoduje słabsze wzmocnienie powierzchniowe sygnału ramanowskiego i stąd ewentualne blokowanie miejsc aktywnych na powierzchni srebra przez składniki osocza.

W trakcie mojej pracy nad zastosowaniem techniki SERS do celów analitycznych, powstało szereg pytań dotyczących stabilności sygnału SERS przy użyciu zoli srebra. W tym celu w ramach pracy magisterskiej pod moim kierunkiem i przy współpracy z Zespołem Prof. dr hab. Z. Adamczyka z Instytutu Katalizy i Fizykochemii Powierzchni PAN w Krakowie, przetestowałam szereg czynników mających wpływ na intensywność i powtarzalność sygnału SERS, tj. średnica nanocząstek srebra i ich stężenie, agregacja pod wpływem elektrolitów, sposób oczyszczania i przechowywania.<sup>14</sup> Wynikiem tych prac było stwierdzenie, że sygnał SERS analitu (wybrano rodaminę 6G, później stosowaną w badaniach *in vitro*) jest zmienny dla różnych syntez danego zolu w zakresie 10 % i aby zwiększyć sygnał analitu i przedłużyć trwałość zolu zalecane jest jego oczyszczanie, np. w procesie ultrafiltracji membranowej. Najlepszą powtarzalnością i stabilnością sygnału charakteryzowały się zole o rozmiarze 40 – 50 nm, co również zaobserwowano dla koloidów złota zastosowanych w badaniach *in vitro*. Praca ta wskazała na konieczność wieloparametrowego badania (UV-Vis, DLS, AFM/SEM, ruchliwość elektroforetyczna) zoli metalu przed ich użyciem w celach analitycznych tak, aby mieć pewność, że intensywność sygnału i jego zależność od stężenia nie jest uwarunkowana właściwościami fizykochemicznego zolu, np. indeksem polidispersyjności, a właściwościami badanego analitu. W swojej pracy badawczej nad wyznaczaniem orientacji bioaktywnych molekuł używałam również jako podłoża SERS schropowaconych elektrod srebra (**H2**, **H3**). Użycie ich było ograniczone do związków zawierających grupy funkcyjne wykazujące silne powinowactwo oddziaływania z powierzchnią metaliczną, np. grupa tiolowa, pierścień fenyłowy, jon karboksylowy lub układy  $\pi$ -elektronowe.

<sup>14</sup> D. Synowiec, *Zastosowanie zoli srebra o wybranych właściwościach fizykochemicznych w powierzchniowym wzmocnieniu rozpraszania ramanowskiego efektu Ramana*, praca magisterska, UJ, Kraków, 2012.



**Rys. 2** Obrazy SEM **A.** chropowatej elektrody srebrnej używanej w moich badaniach, **B.** nanostruktury heksagonalnej przygotowanej przez napylenie warstwy srebra na matrycę aluminiową.

poziomie detekcji pojedynczej molekuly.<sup>15,16</sup> Ponadto, pomiar widma SERS z kilku miejsc danej nanostruktury powinien dostarczyć powtarzalny sygnał badanego analitu, aby móc zastosować takie podłoże do celów analitycznych. W celu zbadania tego problemu, podjęłam prace nad aktywnością SERS czterech nanostruktur w kształcie plastra miodu, które różniły się obecnością nanocząpek i nanoporów oraz rozmiarem komórki (średnicą sześciangu i grubością jego ściany). Szczegóły tych badań są opisane w pracy **H7**, która powstała przy współpracy z Zespołem dr hab. G. Sulki (Wydział Chemii UJ). Przykładowa nanostruktura z nanocząpkami jest przedstawiona na Rys. 2B, charakteryzuje się ona średnicą komórki – 58 nm i średnicą pora - 19 nm. Związkiem chemicznym który użyłam jako analit była rodanina (2-tio-4-ketotiazolidyna). Charakter jej oddziaływania z koloidalnymi nanocząstkami srebra został zdefiniowany przeze mnie we wcześniejszych badaniach.<sup>17</sup> W pracy **H7** wykazałam, że tak zsyntezowane struktury wzmacniają sygnał ramanowski na sposób bardzo podobny do zolu srebra, aczkolwiek granica wykrywalności rodaniny dla tych nanostruktur była o rząd wielkości mniejsza niż dla koloidu srebra bez względu na rodzaj użytej nanostruktury. Dodatkowo zauważyłam, że obecność nanocząpek w sieci sześciangów generuje prawdopodobnie dwa aktywne miejsca oddziaływania rodaniny z tego typu podłożem SERS, co odzwierciedla wzrost

<sup>15</sup> H. Ko, S. Singamaneni, V.V. Tsukruk, *Nanostructured surfaces and assemblies as SERS media*, *Small*, (2008) **4**: 1576-1599.

<sup>16</sup> P.G. Etchegoin, E.C. Le Ru, *A perspective on single molecule SERS: current status and future challenges*, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, (2008) **10**: 6079-6089.

<sup>17</sup> K.M. Marzec, B. Gaweł, W. Lasocha, L.M. Proniewicz, K. Małek, *Interaction model between rhodanine and silver species on nanocolloidal surface and in solid state* *J. Raman Spectrosc.*, (2010) **41**: 543-552.

Wymagały one długiego czasu inkubacji analitem a i tak w wielu przypadkach pomiary SERS przeprowadzałam po odparowaniu roztworu i obserwowałam sporą zmienność profilu widma (**H3**). Preparatyka takiej elektrody, co prawda nie jest czasochłonna, ale utworzenie schropowanej struktury na całej powierzchni jest ograniczone jak pokazano na rysunku 2A. Przedstawia on mikrofotografię SEM elektrody srebrnej używanej w moich badaniach. Jednym z kluczowych aspektów pracy z techniką SERS jest preparatyka podłoża metalicznych dających powtarzalny sygnał analitu o jak największym wzmocnieniu. Większość badań biomedycznych z użyciem techniki SERS jest prowadzonych przy zastosowaniu łatwych w syntezie koloidów srebra i złota. Z drugiej strony, kontrolowana preparatyka nanostruktur o zdefiniowanym kształcie i rozmiarze jest atrakcyjnym rozwiązaniem, zwłaszcza, jeśli dąży się do zastosowań wymagających dużej liczby powtarzalnych w budowie podłoża. Wiele nanostruktur o różnym rozmiarze i kształcie, np. sześciangów, oktaedrów, porów, drutów itp., było badanych pod kątem ich stosowalności w badaniach SERS. Wykazały one, że tak zaprojektowane podłoża mogą efektywnie wzmocnić sygnał ramanowski nawet na

intensywności pasm dla dwóch różnych tautomerów molekuly. Biorąc pod uwagę geometrię i morfologię heksagonalnych nanostruktur, wskazałam na podstawie widm SERS, iż najbardziej efektywnym podłożem jest ten spreparowany na porowatym tlenku glinu, anodowanym w kwasie siarkowym. Charakteryzuje się on mniejszą średnicą nanoporów i struktura jest bardziej upakowana niż dla analogicznego podłoża anodowanego w kwasie szczawiowym. Wykazałam, iż wzrost intensywności sygnału analitu jest odwrotnie proporcjonalny do stosunku rozmiar pora/grubość ściany. Odwrotną tendencję zauważyłam dla nanostruktur przygotowanych na podłożu aluminium posiadających w swojej budowie nanowgłębienia i nanoczapki w wierzchołkach sześciątów. Dla takiej geometrii wydaje się, że istnieje kompensacja rozkładu pola elektromagnetycznego wzmacniającego rozpraszanie ramanowskie pomiędzy blisko położonymi nanoczapkami a długimi nanowgłębieniami, co skutkuje osłabieniem sygnału SERS. W pracach badających stosowność nanostruktur dla spektroskopii SERS zazwyczaj rejestruje się kilka, kilkanaście widm analizując je następnie pod kątem powtarzalności i granicy wykrywalności analitu. W moim podejściu zastosowałam po raz pierwszy, według mojej wiedzy, technikę obrazowania ramanowskiego, aby zarejestrować wariację sygnału na reprezentatywnej powierzchni nanostruktury. Pozwoliło to na obserwację zmian w intensywności pasm dla kilku tysięcy widm. Topografia tej samej powierzchni była następnie wyznaczona przy użyciu mikroskopii sił atomowych, AFM, tak aby skorelować ewentualne zmiany spektralne z defektami powierzchni podłoża SERS. Wyniki tych badań wskazały, że tak przygotowane powierzchnie dostarczają stabilnego sygnału SERS, biorąc pod uwagę mechanizm oddziaływania rodaniny z powierzchnią srebra. Natomiast analiza map SERS dla pasma markerowego rodaniny wskazała na znaczne różnice w intensywności sygnału, które nie zawsze można skorelować z defektami nanostruktury. Na tym etapie badań wydaje się, że przyczyną mogą być niewielkie zmiany w grubości warstwy srebra, niemierzalne techniką AFM lub zmiany w kinetyce adsorpcji molekuł rodaniny. Te badania zwróciły moją uwagę na fakt, że zdefiniowane w kształcie i rozmiarze nanostruktury nie są jednak *panaceum* dla badań analitycznych z zastosowaniem SERS. Niewątpliwie są użyteczne w korelowaniu danych eksperymentalnych z teoretycznymi obliczeniami skierowanymi w kierunku określenia mechanizmu i siły wzmocnienia powierzchniowego, dla których słabo-zdefiniowane agregaty nanocząstek metalu w roztworze nie oddają rozmiarów miejsc aktywnych i stąd uniemożliwiają modelowanie.

### 3/ Ocena informacji chemicznej w badaniach *in vitro*:

Jednym z zastosowań spektroskopii SERS do określenia składu i właściwości układów biologicznych jest przyłączanie molekuł o wysokim przekroju czynnym na zjawisko SERS (tzw. reporterów ramanowskich) do koloidalnych nanocząstek złota (AuNPs) i następnie wprowadzenie ich do wnętrza komórek.<sup>18, 19, 20</sup> Proces transportu do wnętrza komórek jest zależny od rodzaju cząstek i typu komórek a wybór reportera ramanowskiego jest podyktowany spodziewaną odpowiedzią spektralną analizowanego układu rejestrowaną w widmach SERS. W swoich badaniach, opisanych w pracach **H8-H10**, skupiłam się na komórkach makroflagów i śródbłonna a jako reporter ramanowski

<sup>18</sup> W.E. Doering, M.E. Piotti, M.J. Natan, R.G. Freeman, *SERS as foundation for nanoscale, optically detected biological labels*, Adv. Mat., (2007) **19**: 3100-3108.

<sup>19</sup> J.P. Scaffidi, M.K. Gregas, V. Seewaldt, T. Vo-Dinh, *SERS-based plasmonic nanobiosensing in single living cells*, Anal. Bioanal. Chem., (2009) **393**: 1135-1141.

<sup>20</sup> A. Matschulat, D. Drescher, J. Kneipp, *Surface-enhanced Raman scattering hybrid nanoprobe multiplexing and imaging in biological systems*, ACS Nano, (2010) **4**: 3259-3269.

wybrałam szereg organicznych barwników mających jednocześnie właściwości fluorescencyjne (jako referencja do metody SERS) oraz kwas 4-merkaptobenzoesowy (czuły na zmianę pH). Wybór barwników organicznych wynikał z możliwości optymalnego śledzenia ich dystrybucji we wnętrzu komórki oraz łatwego ich zastępowania przez biomolekuły znajdujące się w bezpośrednim sąsiedztwie powierzchni metalu. Badania te były prowadzone w ramach projektu Nr 3 w Zał. 2a. W pierwszym etapie testowana była seria barwników organicznych (rodamina B, rodamina 6G, zieleń malachitowa, róż bengalski, fiolet krystaliczny i błękit tryptanowy), nieopisanych dotąd w literaturze w kontekście badań *in vitro* z użyciem spektroskopii SERS, za wyjątkiem fioletu krystalicznego. Badano również ich charakterystykę SERS używając jako podłoża metalicznego - nanocząstek złota o średnicy od 15 do 60 nm. Badania te były prowadzone w ramach pracy magisterskiej mgr P. Krali, w której pełniłam funkcję promotora. Przeprowadzone doświadczenia miały na celu określenie stabilności sygnału SERS dla danego barwnika i danej średnicy nanocząstki metalu oraz ich zachowania w komórkach.<sup>21</sup> Na ich podstawie do badań *in vitro* na komórkach makrofagów jako najczęściej wybieranych układach ze względu na szybki transport nanocząstek do ich wnętrza, wybrano rodaminę 6G, rodaminę B i zieleń malachitową i nanocząstki złota o rozmiarze 40-45 nm. Wyniki tych badań są omówione szczegółowo w pracy **H8**. Mapowanie SERS i pomiar cytotoxyczości wykazały, że każdy rodzaj reportera jest przyłączony do cząstek złota po ich transporcie do komórek nie powodując ich nekrozy. Analiza map SERS opracowanych przy użyciu metody skupień (k-średnich) wykazała, że po 12 h inkubacji komórek nanocząstkami są one rozmieszczone wzdłuż membrany i generują dwójakiego rodzaju informację chemiczną, tj. pokazują typowy profil SERS barwników (ich oddziaływanie z powierzchnią metalu nie zmienia się w przestrzeni wewnątrzkomórkowej) oraz wzmocnienie drgań molekuł typowych dla układów biologicznych. Taki sygnał SERS biomolekuł został zaobserwowany tylko gdy użyto nanocząstek z przyłączonymi molekułami rodamin 6G i B ale nie zieleni malachitowej. Jest to związane z silniejszym oddziaływaniem tego ostatniego barwnika z powierzchnią metalu. Badania te wykazały również, że otrzymuje się bogatszą informację biologiczną dla inkubacji makrofagów nanocząstkami AuNPs/rodamina 6G niż AuNPs/rodamina B. Identyfikacja pasm w widmach SERS wskazała, że takie podejście w badaniach *in vitro* dostarcza informacji o resztach aminokwasowych zawierających układ aromatyczny, purynach, pirymidynach jak i lipidach i białkach. Wynikiem tych badań było stwierdzenie, że dla dalszego zastosowania techniki SERS w badaniach *in vitro* sugeruje się wybór nanocząstek złota o średnicy 40 nm i rodamin 6G jako reportera ramanowskiego.

Prowadząc tego rodzaju badania z zastosowaniem techniki SERS, zwłaszcza skupiając się na wybranym typie komórek, wymagane jest wieloparametrowe określenie biogodności, mechanizmu wychwytu nanonośników i ich dystrybucji we wnętrzu komórek. Takie badania zostały przeprowadzone dla żywych komórek śródbłonna EA.hy926 (ludzkie komórki śródbłonna żyły pępowinowej) z wykorzystaniem nanocząstek złota i rodamin 6G do pomiarów SERS. Badania opisane są w pracy **H9**. Wychwył nanonośników został określony przez 2D i konfokalną spektroskopię fluorescencyjną poprzez wykorzystanie właściwości fluorescencyjnych reportera ramanowskiego. Takie wielokierunkowe podejście do oceny procesów związanych z wychwytem SERS nanonośników jest jako jedno z nielicznych w literaturze. Ta seria eksperymentów wykazała, że wychwył nanocząstek uformowanych z AuNPs/R6G jest zjawiskiem wysycającym się po 2 godzinach inkubacji, po którym następuje powolny eksport cząstek z komórek. Porównując wychwył samego reportera i reportera przyłączonego do podłoża SERS widoczne jest, że proces dyfuzji molekuł rodamin 6G jest porównywalny do wychwył 40 nm nanocząstek złota, co świadczy o wydajnym transporcie

<sup>21</sup> P. Krali, *Optymalizacja cząstek złota do obrazowania SERS pojedynczych komórek*, praca magisterska, UJ, Kraków, 2013.



nanoznaczyków przez komórki śródbłonna. Z kolei zmiany intensywności fluorescencji rodamin 6G zmierzonej dla komórek przetrzymywanych w warunkach o niższej temperaturze niż 37 °C wskazały że dominującym mechanizmem jest proces aktywnego wychwytu – endocytoza, w którym nanocząstki są otaczane przez utworzone w błonie wakuole i dalej transportowane do wnętrza komórki. 2D i konfokalna mikroskopia fluorescencyjna wskazały dystrybucję reportera ramanowskiego w cytozolu, bez naruszenia granicy z jądrem komórkowym. Zaobserwowaliśmy również agregaty molekuł rodamin 6G. Tu należy podkreślić, że pomiary fluorescencyjne dostarczają jedynie informacji o reporterze, nie można na ich podstawie wnioskować o dystrybucji reportera przyłączonego do nanocząstki metalu w przeciwieństwie do spektroskopii SERS. Następnie, wykazaliśmy na podstawie mapowania SERS komórek w zależności od czasu inkubacji, że największe stężenie AuNPs/R6G obserwuje się już po 0,5 h i wraz z wydłużeniem czasu następuje „wymiana” molekuł w bezpośrednim sąsiedztwie nanocząstki złota, a układy AuNPs/R6G migrują w kierunku błony komórkowej. Stąd, już po krótkim czasie obserwuje się wzmocnienie SERS drgań lipidów i białek, a po 4-godzinnej inkubacji pasma reszt aminokwasowych, puryn i pirymidyn; podobnie do informacji spektralnej uzyskanej dla makrofagów w pracy **H9**. Tak opracowany protokół wskazał na duży potencjał techniki SERS dla określenia biochemicznego składu żywych komórek.

Reporterem ramanowskim może być również związek chemiczny, który jest czuły na specyficzną zmianę chemiczną, np. zmianę równowagi kwasowo-zasadowej, potencjału redoks. Jednym z ważnych zagadnień w chemizmie komórek jest zmiana pH wewnątrzkomórkowego,  $\text{pH}_i$ , często specyficznego dla danej dysfunkcji komórki. Na przykład, w komórkach nowotworowych,  $\text{pH}_i$  jest kwaśne.<sup>22</sup> Znając już ogólny mechanizm, który ma miejsce przy wychwycie nanocząstek złota przez komórki śródbłonna, zastosowaliśmy jako reporter ramanowski kwas 4-merkaptobenzoesowy, którego grupa karboksylowa ulega deprotonacji na skutek nawet niewielkiej zmiany pH (**H10**). Potencjał zastosowania tego czujnika pH i spektroskopii SERS w wyznaczeniu  $\text{pH}_i$  dla różnego typu komórek wykazano w kilku pracach.<sup>23</sup> W pracy **H10**, określiliśmy nie tylko dystrybucję wartości pH w zdrowych komórkach śródbłonna, ale także badaliśmy zmiany na skutek warunków stresowych, tj. na skutek zalkalizowania i zakwaszenia środowiska zewnątrzkomórkowego i indukowania dysfunkcji komórki czynnikiem martwicy nowotworu (TNF- $\alpha$ ). Wartości pH obliczone na podstawie równania Hendersona-Hasselbacha (wyznaczonego w tej pracy) są zgodne ze spodziewaną odpowiedzią komórek na stres środowiskowy. Przy czym, zaobserwowaliśmy, że dla komórek narażonych na kwaśne pH i TNF- $\alpha$ , wychwyty nanoznaczyków był znacznie większy niż dla tych inkubowanych w zasadowym medium i w kontroli. Oznacza to, że w tych warunkach wzrasta przepuszczalność błony komórkowej co potwierdzają dane literaturowe.<sup>24</sup> Dyskusję nad interpretacją obserwowanej dystrybucji wartości  $\text{pH}_i$  oparłam na procesie dojrzewania endosomów i ich przemianie do lizosomów. Struktury te powstają na skutek transportu membranowego w procesie endocytozy a zaburzenie

<sup>22</sup> F.B. Loisselle, J.R. Casey, *Membrane transporters w Drug discovery and development, Methods in molecular Biology*, red. Q. Yan, Springer Science+Business Media, 2010, vol. 637.

<sup>23</sup> J. Kneipp, H. Kneipp, B. Witting, K. Kneipp, *Following the dynamics of pH in endosomes of live cells with SERS nanosensors*, *J. Phys. Chem. C*, (2010) **114**: 7421-7426; F. Wang, R. Widejko, Z. Yang, K.T. Nguyen, H. Chen, L.P. Fernando, K.A. Christensen, J.N. Anker, *Surface-enhanced Raman scattering detection of pH with silica-encapsulated 4-mercaptobenzoic acid-functionalized silver nanoparticles*, *Anal. Chem.*, (2012) **84**: 8013-8019; V.T. Kong, E.O. Ganbold, J.K. Saha, J. Jang, J. Min, J. Choo, S. Kim, N.W. Song, S.J. Son, S.B. Lee, S.W. Joo, *Gold Nanoparticle Silica Nanopeapods*, *J. Am. Chem. Soc.*, (2014) **136**: 3833-3841.

<sup>24</sup> N. Oku, R. Araki, S. Shibamoto, F. Ito, T. Nishihara, M. Tsujimoto, *Tumor necrosis factor-induced permeability increase of negatively charged phospholipid vesicles*, *J. Biochem.*, (1987) **102**: 1303-1310.

poszczególnych etapów jest ważnym wskaźnikiem rozwoju patologii komórki. Praca ta wykazała, że spektroskopia SERS jest czuła na śledzenie takich zmian.

#### 4.3.3. Podsumowanie – najważniejsze osiągnięcia i elementy nowości naukowej

W ramach badań przedstawionych w cyklu prac habilitacyjnych przeprowadziłam systematyczne eksperymenty ukazujące zastosowanie spektroskopii SERS do badań o znaczeniu farmakologicznym i medycznym. Wyniki, szczegółowo omówione w każdej publikacji, dostarczyły szeregu ważnych informacji dotyczących oddziaływań modelowych molekuł wykazujących działanie biologiczne z powierzchnią metalu oraz ich zachowanie w układach biologicznych. Realizacja nakreślonych ogólnych celów badawczych pozwoliła na uzyskanie następujących osiągnięć oraz sformułowanie wniosków:

1/ Wskazanie, że profil widma SERS dehydropeptydów jest silnie zależny od otoczenia chemicznego reszty dehydroaminokwasowej. Wykazanie, że szczegółowy sposób adsorpcji tego typu modyfikacji reszt aminokwasowych z powierzchnią metalu, i potencjalnie z centrum aktywnym w układach biologicznych, wynika z układu łańcucha peptydowego a nie rodzaju dehydroaminokwasu. Wykazanie silnego powinowactwa jonu karboksylowego do powierzchni metalu, który determinuje wkład układu styrylowego do mechanizmu adsorpcji.

2/ Wskazanie, że sygnał ramanowski wzmocniony powierzchniowo oddaje nawet minimalne różnice strukturalne pomiędzy lekami przeciwdepresyjnymi oraz że poszukiwanie odpowiednich markerów w widmach SERS wskazuje na charakter ulokowania się ligandów w membranie receptorów. Wysoce nowatorski charakter analizy został podkreślony w trzech recenzjach manuskryptu opublikowanego w *Journal of Colloid and Interface Science* w 2014 roku.

3/ Wskazanie na możliwość zastosowania spektroskopii SERS w analizie ilościowej leków przeciwdepresyjnych, przy czym metabolit leku może być trudniej oznaczany niż sam lek. Wykazanie możliwości opracowania procedury detekcji leków przeciwdepresyjnych bez ich ekstrakcji z osocza.

4/ Zaproponowanie analizy nowych nanostruktur jako podłoży SERS oraz określenie ich przydatności do celów analitycznych w porównaniu do zolów metalu na przykładzie struktury plastra miodu. Wykazanie, iż modyfikacja matrycy może prowadzić do utworzenia kilku miejsc aktywnych prowadzących do wzmocnienia sygnału ramanowskiego różnych tautomerów oraz do znacznych różnic w intensyfikacji sygnału SERS.

5/ Zaproponowanie rodaminy 6G i rodaminy B jako reporterów ramanowskich do badań *in vitro*, w tym wykazanie mechanizmu wychwytu nanoznaczyków i ich dystrybucji w komórkach makrofagów i śródbłonna. Wskazanie jaka informacja chemiczna może być uzyskana w danym czasie inkubacji komórek nanoznaczykami.

6/ Zastosowanie nanoznaczyków do określenia rozkładu wewnątrzkomórkowego pH na skutek stresu środowiskowego i zmiany patologicznej. Ponadto, określenie ścieżki przemian endosomalnych zachodzących na skutek stresu mogących być markerami dysfunkcji aparatu komórkowego.

Powyższe wnioski mają znaczenie poznawcze, lecz mają też charakter badań aplikacyjnych, ponieważ pozwalają na lepsze zrozumienie oddziaływań biomolekuła - powierzchnia metalu

stanowiących istotę spektroskopii SERS. Proponowane wnioski z szeregu doświadczeń przeprowadzonych przeze mnie mogą ułatwić na przykład projektowanie leków i wyjaśnienie mechanizmu ich działania, rozwijać metody ich detekcji w materiale biologicznym, projektować i wyjaśniać mechanizm działania podłoża SERS o zdefiniowanej strukturze oraz śledzić zmiany patologiczne w badaniach *in vitro*.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Prace badawcze prowadzone przeze mnie na Wydziale Chemii UJ dotyczą zagadnień związanych z zastosowaniem spektroskopii oscylacyjnej w określeniu struktury molekularnej związków organicznych i związków kompleksowych, mechanizmu adsorpcji na powierzchni metalicznej oraz wyznaczenie markerów spektralnych chorób cywilizacyjnych w tkankach i komórkach zwierzęcych i składnikach krwi. W badaniach swoich podjęłam też wątek określenia składu i dystrybucji materiałów malarskich oraz produktów ich degradacji w próbkach malarstwa ściennego i sztalugowego. Głównymi narzędziami jakimi posługuję się w pracy badawczej są spektroskopia FTIR i ramanowska z uwzględnieniem technik obrazowania, SERS oraz obliczenia kwantowo-chemiczne i analiza chemometryczna. Główny nurt moich aktualnych badań został przedstawiony przy omówieniu prac stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego. Poniżej przedstawiona jest tematyka badawcza realizowana przed uzyskaniem stopnia doktora nauk chemicznych, a także prowadzona równoległe z pracami habilitacyjnymi.

Po ukończeniu pracy magisterskiej w Zakładzie Chemii Teoretycznej Wydziału Chemii UJ, w trakcie której wyznaczałam stany Frenkla i te z przeniesieniem ładunku w domieszkowanych kryształach molekularnych, rozpoczęłam w 1998 roku Studia Doktoranckie w Zakładzie Fizyki Chemicznej tegoż Wydziału, w Zespole Spektroskopii Oscylacyjnej. Pracę doktorską zatytułowaną *Zastosowanie metod spektroskopii molekularnej do wyznaczania struktur oksymów i ich związków kompleksowych z jonami Ni(II) i Cu(II)* przygotowałam pod kierunkiem Prof. dr hab. L.M. Proniewicza. W ramach pracy doktorskiej określiłam strukturę molekularną serii oksymów w cieple stałym i roztworze za pomocą spektroskopii FTIR, ramanowskiej i NMR. Badania doświadczalne były oparte na obliczeniach kwantowo-chemicznych i wyznaczeniu rozkładu energii potencjalnej drgań normalnych oraz rozkładzie ładunków atomowych. Podjęłam również próbę rejestracji widm FTIR w matrycach niskotemperaturowych w trakcie Studiów Doktoranckich na Uniwersytecie Floryda w Gainesville (USA), aczkolwiek ta klasa związków ulega rozkładowi w trakcie napyłania na matrycę. Kontynuując pracę doktorską, zsyntezowałam związki kompleksowe z jonami niklu (II) i miedzi (II). Wybór jonów metali podyktowany był potencjalnym działaniem farmakologicznym oksymów i ich zdolnością koordynowania biogennych jonów metali. Wyznaczyłam ich strukturę molekularną w cieple stałym przy użyciu spektroskopii FTIR, ramanowskiej i EPR oraz obliczeń DFT wskazując sposób koordynacji poprzez grupę oksymową i karboksylową. Zebrane dane podczas realizacji pracy zostały porównane z wynikami potencjometrycznymi prowadzonymi dla roztworów tychże kompleksów. Wszystkie uzyskane w ramach pracy wyniki zostały opublikowane w formie trzech pełnotekstowych artykułów naukowych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym (publikacje 24-26 w Zał. 2a.IA), jednym pełnotekstowym artykule jako rozdział w monografii (publikacja 14 w Zał. 2a.IC) oraz jako recenzowana publikacja pokonferencyjna (publikacja 20 w Zał. 2a.IC).

Po obronie pracy doktorskiej w 2003 roku, moja działalność naukowa jako asystenta wpisała się w zakres prac badawczych prowadzonych w Zespole Spektroskopii Oscylacyjnej pod kierunkiem Prof. dr hab. L.M. Proniewicza. Skoncentrowana była na modelowaniu kwantowo-chemicznym struktury molekularnej szeregu związków chemicznych posiadających w swojej budowie pierścien heterocykliczny, tj. soli di- i triazolowe, 1,3,4-oksodiazole, rodaniny i dibenzotiofeny. Modelowanie to i analiza widm oscylacyjnych wykazała różnice strukturalne na skutek zmiany podstawnika w pierścieniu. Dokonałam teoretycznej interpretacji widm oscylacyjnych i wskazałam zakresy częstości, które mogą służyć analizie strukturalnej tychże związków. Dodatkowo badałam wpływ podstawników na takie właściwości fizyko-chemiczne jak rozkład ładunków atomowych i aromatyczność pierścieni heterocyklicznych i skumulowanego z nimi pierścienia fenylogo, wykazując sposób przepływu ładunku pomiędzy pierścieniami i modyfikowania takiego przepływu poprzez zmianę podstawnika. Wyniki tych prac zostały opublikowane w formie pięciu pełnotekstowych artykułów naukowych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym (publikacje 18-22 w Zał. 2a.IA) oraz jednym pełnotekstowym artykule jako rozdział w monografii (publikacja 13 w Zał. 2a.IC). Doświadczenie i wiedza jaką uzyskałam w tej części mojej działalności naukowej była również podstawą do przygotowania dwóch rozdziałów w monografiach (publikacje 4,9 w Zał. 2a.IC). Pobocznym aspektem mojej działalności naukowej była współpraca przy modelowaniu kwantowo-chemicznym konformerów i ich przemianą fotochemiczną w cząsteczce  $\alpha$ -terpinenu zaobserwowanych w widmach FTIR zarejestrowanych w matrycach niskotemperaturowych (publikacje 15 w Zał. 2a.IA i 16 w Zał. 2a.IC).

Kontynuowałam również badania nad wyznaczeniem struktury molekularnej związków kompleksowych w ciele stałym przy użyciu spektroskopii oscylacyjnej i obliczeń DFT (publikacje 13 i 16 w Zał. 2a.IA). Ligandem był związek heterocykliczny – rodanina dla którego wyznaczyliśmy stabilne energetycznie tautomery. Badaliśmy również jej pochodne (publikacje 10, 11 w Zał. 2a.IC). Zsyntezowane zostały związki kompleksowe z jonami srebra i ołowiu (II). Przy współpracy z Zespołem Prof. dr hab. W. Łasochy (Wydział Chemii UJ) wyznaczyliśmy strukturę techniką dyfraktometrii proszkowej dla obu kompleksów. Dla kompleksu z jonami srebra, związek koordynacyjny formuje strukturę polimerową o kształcie helisy, w której jony metalu są koordynowane przez atom azotu i poza pierścieniowy atom siarki. Z kolei w przypadku kompleksu jonów zaproponowaliśmy nietypową strukturę dimeru, w którym jony ołowiu tworzą układ  $Pb^+ - Pb^+$ . Dla obu kompleksów zaproponowaliśmy teoretyczną interpretację widm oscylacyjnych pomocną w analizie tego typu związków kompleksowych oraz ich struktury.

Pracę badawczą z zastosowaniem spektroskopii SERS rozpoczęłam od wyznaczenia sposobu adsorpcji pochodnej adenozyiny przyłączonej do eteru benzokoronowego (publikacja 17 w Zał. 2a.IA, prace badawcze w ramach projektu Nr 8 w Zał. 2a.IH). Tego typu klasa związków jest wykorzystywana w projektowaniu nośników leków w transporcie komórkowym, znaczników fluorescencyjnych i wykazuje właściwości kompleksujące jonów metalu. Przy zastosowaniu obliczeń DFT podałam szczegółową interpretację widm oscylacyjnych oraz rozkład ładunków atomowych i jego zmianę na skutek połączenia poszczególnych fragmentów molekuly. Interpretacja widma SERS wskazała, że adenina i eter koronowy przyjmuje orientację pochyłą względem powierzchni srebra a grupy iminowe i ryboza jest prostopadła.

W trakcie stażu naukowego w Instituto de Estructura de la Materia w Madrycie w 2008 r. pod kierunkiem Prof. J. Garcia Ramos zapoznałam się z procedurą syntezy nanocząstek srebra i złota jako podłoża metalicznych, rejestracją i interpretacją widm SERS. Od tej chwili rozpoczęłam samodzielne badania z wykorzystaniem techniki SERS a w 2009 r. rozpoczęłam pracę w Zespole Obrazowania Ramanowskiego Zakładu Fizyki Chemicznej pod kierunkiem prof. dr hab. Małgorzaty Barańskiej.

Poza cyklem publikacji przedstawionych jako podstawa postępowania habilitacyjnego, pracowałam nad wyznaczeniem mechanizmu adsorpcji rodaniny i soli pirydyniowych na nanocząstkach srebra (publikacje 7, 10, 11, 16 w Zał. 2a.IA, prace badawcze w ramach projektu Nr 3 w Zał. 2a.IH). Mechanizm adsorpcji rodaniny porównaliśmy z jej sposobem koordynacji jonów srebra, jak opisano powyżej, a seria soli pirydyniowych była badana pod kątem zmian w mechanizmie adsorpcji w zależności od rodzaju podstawnika i jego pozycji w pierścieniu. Z kolei pomiary widm SERS pirydyny zarejestrowane przy użyciu nanocząstek srebra o różnej średnicy, różnych aktywatorów i przy wzbudzeniu laserowym z zakresu Vis i NIR dały podstawę dla modelowania DFT widm SERS tego układu (publikacja 14 w Zał. 2a.IA).

Pobocznym aspektem mojej pracy naukowej było zastosowanie obrazowania FTIR i ramanowskiego do identyfikacji i dystrybucji materiałów malarskich oraz produktów degradacji w szlifach pobranych z malarstwa ściennego i sztalugowego. Prace te były prowadzone w ramach współpracy z dr hab. Z. Kaszowską z Akademii Sztuk Pięknych w Krakowie (publikacje 8, 9 w Zał. 2a.IA i 5 w Zał. 2a.IC). Dla serii warstw malarskich zawierających pigmenty o różnej barwie zaproponowaliśmy pasma markerowe w widmach FTIR dla mydeł jako najczęściej spotykanych produktów degradacji dzieł malarskich. Zaproponowałam po raz pierwszy w literaturze wykorzystanie analizy skupień do konstrukcji map FTIR obrazujących współlokalizację składników w warstwie malarskiej. Aktualnie dalej prowadzone są prace nad opracowaniem protokołu identyfikacji produktów degradacji w zależności od składu pigmentów, spoiw i wypełniaczy przy pomocy spektroskopii FTIR i analizy chemometrycznej.

Udział w projektach Nr 2 i 3 (Zał. 2a.IH) umożliwił mi rozwój ścieżki badań w kierunku zastosowania spektroskopii oscylacyjnej do określenia stanu biochemicznego tkanek i komórek zwierzęcych, osocza krwi i jego zmiany na skutek rozwoju stanu patologicznego w modelach zwierzęcych (publikacje 1-6, 12 w Zał. 2a.IA i 1-3 w Zał. 2a.IC). Staże naukowe w wiodących ośrodkach badawczych prowadzących tego typu badania pod kierunkiem Prof. B.R. Wooda (Monash University, Australia) i Prof. R. Bhargavy (Beckman Institute of Advanced Technology, USA) pozwoliły mi na zapoznanie się z aktualnymi trendami w przygotowaniu próbek, technik pomiarowych materiału biologicznego i sposobu analizy widm oscylacyjnych. Na Wydziale Chemii UJ i przy współpracy z Jagiellońskim Centrum Rozwoju Leków (JCET) brałam udział w badaniach nad określeniem składu estrów trójglicerydów i cholesterolu w blaszce miażdżycowej przy pomocy obrazowania FTIR aort mysich i analizy skupień. Współpracowałam również przy wyznaczeniu pasm markerowych w widmach FTIR i ramanowskich serii narządów zwierzęcych proponując jako alternatywę do preparatyki przekrojów tkanek pomiary widm oscylacyjnych homogenatów tkankowych. Szczególne zainteresowania badawcze skierowałam na oznaczenie stanu patologicznego i skutków jego leczenia (modele cukrzycy, miażdżycy, nadciśnienia płucnego i systemowego, przerzutowości nowotworowej) w osoczu krwi, ze względu na fakt, iż pobranie takiego materiału jest najmniej inwazyjne dla pacjenta a większość badań medycznych jest skoncentrowana na wyznaczeniu

markerów choroby w osoczu i surowicy. W pierwszym kroku zwróciłam uwagę na potrzebę opracowania odpowiedniego protokołu przygotowania próbki osocza i sposobu rejestracji jego widm FTIR, tj. wpływ antykoagulantu na profil spektralny osocza i wyznaczenie różnic/podobieństw w widmach zarejestrowanych technikami transfleksji i transmisji. Są to powszechnie używane techniki w obrazowaniu FTIR materiału biologicznego. Zaobserwowaliśmy po raz pierwszy i podjęliśmy próbę wyjaśnienia zmiany w profilu białkowym rejestrowanym w widmach transfleksji. Zaproponowaliśmy również markery osocza w nadciśnieniu płucnym, trudno diagnozowanym dostępnymi aktualnie testami medycznymi, które zidentyfikowaliśmy w widmach FTIR przy pomocy analizy głównych składników. Wykazaliśmy, że profil spektralny nadciśnienia płucnego jej wyraźnie różny od cech widma osocza z modelu nadciśnienia systemowego. Prowadzone są dalsze prace nad określeniem profilu FTIR cukrzycy i jej leczenia oraz przerzutowości nowotworowej.

### **Plany na przyszłość i perspektywy rozwoju**

W ramach dalszych prac zamierzam kontynuować część tematyki badawczej związanej z oznaczaniem chemizmu komórek przy użyciu spektroskopii SERS. W najbliższym czasie będę kontynuować wyznaczanie wewnątrzkomórkowego pH w komórkach śródbłonka w różnych typach dysfunkcjach. Badania te będą uzupełnione pomiarami fluorescencyjnymi i mikroskopią elektronową (TEM) tak, aby uściślić ścieżkę wychwytu nanocząstek i ich dystrybucję wewnątrz komórki. Swoje prace zamierzam też ukierunkować na sfunkcjonalizowanie nanocząstek metalu reporterem ramanowskim i przeciwciałem celowanym na rozpoznanie patologii śródbłonka i komórek nowotworowych na powierzchni błony komórkowej rejestrując sygnał SERS. Wstępne prace w tym kierunku zostały już rozpoczęte.

Moje zainteresowania naukowe koncentrują się wokół badań o charakterze biomedycznym, kontynuować i rozwijać będę badania dotyczące potencjalnej diagnostyki chorób cywilizacyjnych na podstawie widm FTIR i ramanowskich. W ciągu najbliższych lat będę brać udział w projekcie STRATEGMED „Farmakoterapia śródbłonka naczyniowego i aktywacji płytek krwi zależna od prostacykliny, tlenku azotu i tlenku węgla – nowa strategia w zapobieganiu przerzutowości nowotworowej” (Projekt Nr 1 w Zał., 2aH) oraz akcji COST Raman4Clinics (Horyzont 2020) w którym będę opracowywać protokół pomiaru widm FTIR i ramanowskich osocza w celu wskazania markerów stanu chorobowego. Dodatkowym zadaniem badawczym, który chce zgłębić jest zastosowanie obu technik spektroskopii oscylacyjnej do badań płytek krwi, których aktywacja jest często wskaźnikiem patologii. Wstępne badania, które rozpoczęłam w ramach jednej z prac magisterskich, nad którą sprawuję opiekę, wskazują na potrzebę opracowania wielokierunkowego protokołu przygotowania próbek do pomiarów zanim przystąpi się do etapu wskazania markerów chorobowych.

## 6. Podsumowanie najważniejszych aspektów aktywności naukowej, dydaktycznej i organizacyjnej

1. Całkowita liczba publikacji: **53** + 3 w recenzji (po doktoracie 52)
2. Liczba publikacji z Listy Filadelfijskiej: **32** + 3 w recenzji, w tym jako autor korespondencyjny: **22**
3. Liczba publikacji recenzowanych, o zasięgu międzynarodowym spoza Listy Filadelfijskiej: **3**, w tym jako autor korespondencyjny: **2**
4. Rozdziały w monografiach: **12** w tym edytor: **1**
5. Publikacje w materiałach pokonferencyjnych: **6**
6. Sumaryczny IF zgodnie z rokiem opublikowania: **84,377**
7. Średni IF na publikację z Listy Filadelfijskiej: **2,637** wg roku opublikowania:
8. Liczba wszystkich cytowań<sup>25</sup>:  

wg bazy Web of Science: **136** (bez autocytowań: **107**)

wg bazy Scopus: **145** (bez autocytowań: **115**)
9. Indeks Hirscha<sup>25</sup>:  

wg bazy Web of Science: **8**

wg bazy Scopus: **7**
10. Zgłoszenia patentowe: **1**
11. Udział w projektach: **11** (w tym jako kierownik: **3**)
12. Aktywny udział w konferencjach i seminariach naukowych po doktoracie:
  - a. referaty: **15**, w tym na zaproszenie: **7**
  - b. prezentacje posterowe: **40**
  - c. członek komitetu naukowego: **4** i organizacyjnego: **3**
13. Opieka nad studentami:
  - a. promotor pomocniczy prac doktorskich: **2**
  - b. promotor prac magisterskich: **13**
  - c. opiekun naukowy prac magisterskich: **5**
  - d. promotor prac licencjackich: **2**
14. Działalność dydaktyczna:
  - a. prowadzenie i opracowanie wykładów: **6**
  - b. prowadzenie laboratorium, w tym dla paneli specjalizacyjnych i studiów podyplomowych: **8**
  - c. koordynowanie kursów zajęć laboratoryjnych: **2**
  - d. opracowanie instrukcji do ćwiczeń: **16**
  - e. udział w przygotowaniu podręczników: **3** + 1 w przygotowaniu
15. Pełnienie funkcji recenzenta:
  - a. publikacji w czasopiśmie międzynarodowych: **32**
  - b. projektów w programie FP7 i Horyzont 2020: **108**

---

<sup>25</sup> na dzień 7 stycznia 2015 r.

16. Działalność organizacyjna (szczegóły w Zał. 2a):
- a. członek Rady Wydziału Chemii UJ i Wydziałowych Komisji: ds. Finansów, Kadry i Organizacji, Dydaktycznej, Wyborczej, Zespołu ds. oceny efektów kształcenia dla kierunku Chemia
  - b. udział w modernizacji laboratorium badawczego Zakładu Fizyki Chemicznej (ZFCh) UJ oraz w projektowaniu laboratoriów Zespołu Obrazowania Ramanowskiego w nowym budynku WCh UJ na III Kampusie UJ; koordynacja zajęć dydaktycznych w Zakładzie Fizyki Chemicznej; przeprowadzanie inwentaryzacji środków trwałych w ZFCh; prowadzenie strony internetowej, opieka nad utylizacją odczynników, przygotowanie rocznych sprawozdań zespołowych dla Zespołu Spektroskopii Oscylacyjnej; opieka nad spektrometrem do obrazowania FTIR i szkolenie użytkowników.



Kraków, 19 stycznia 2015 r.